Aus dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie

Direktor: Prof. Dr. phil. Wolrad Vogell

Galaktose-Partikel Rezeptor vermittelte Zellkontakte zwischen Lebermakrophagen und Erythrozyten: Elektronenmikroskopische Untersuchung und quantitative Beschreibung der Bindungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Hoffmann

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0060

Aus dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie

Direktor: Prof. Dr. phil. Wolrad Vogell

Galaktose-Partikel Rezeptor vermittelte Zellkontakte zwischen Lebermakrophagen und Erythrozyten: Elektronenmikroskopische Untersuchung und quantitative Beschreibung der Bindungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Hoffmann

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof.Dr.Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr.Vogell
Korreferent
gez.: Prof. Dr.Kolb

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Feinbau der Leber	3
2.2	Funktionen der Kupfferzelle	5
2.3	Das Galaktose-Partikel Lektin	6
2.4	Spezielle Fragestellung	9
3.	Material und Methoden	11
3.1	Abkürzungen	11
3.2	Verwendete Substanzen und Lösungen	12
3.3	Versuchstiere	14
3.4	Isolierung und Anreicherung von Hepatozyten und Kupfferzellen	15
3.4.1	Das Perfusionssystem	15
3.4.2	Perfusion der Leber	16
3.4.3	Trennung und Anreicherung von Hepatozyten und Kupfferzellen	17
3.4.4	Lichtmikroskopische Identifizierung von Kupfferzellen und Hepatozyten	18
3.4.5	Prüfung der Vitalität	2o
3.5	Erythrozyten	21
3.5.1	Gewinnung der Erythrozytensuspensionen	21
3.5.2	Neuraminidasebehandlung der Erythrozyten	22
3.5.3	Kopplung von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) an Ratten-Erythrozyten (RaRBC)	22
3.5.4	Trennung von alten und jungen Ratten-Erythrozyten auf einem Percoll-Gradienten	23
3.6	Der Bindungstest	25
3.7	Aufarbeitung von Zellmaterial für die Elektronenmikroskopie	26
3.7.1	Rosettentest für die Einbettung	26

3.7.2	Fixierung der Rosetten	27
3.7.3	Entwässerung	27
3.7.4	Einbettung der Rosetten in Spurr-Medium	28
3.8	Ultramikrotomie	28
3.9	Kontrastierung von Dünnschnitten	29
3.1o	Morphometrische Auswertung	29
4.	Ergebnisse	32
4.1	Erkennung desialylierter Erythrozyten der Ratte durch Kupfferzellen und Hepatozyten	32
4.2	Kupfferzellmorphologie	33
4.3	Ultrastrukturelle Analyse der Zellkontakte zwischen Kupfferzellen und desialylierten Ratten-Erythrozyten	36
4.4	Analyse der Zellkontakte zwischen isolierten Hepatozyten und desialylierten Ratten-Erythrozyten	41
4.5	Temperatureinfluß und Einfluß der Phagozytosevorbelastung von Kupfferzellen auf die Ausbildung Lektin vermittelter Zellkontakte	43
4.5.1	Quantitative Beschreibung der Zellkontakte	44
4.6	Zellkontakte zwischen Kupfferzellen und xenogenen Erythrozyten	5o
4.6.1	Ultrastruktur der Zellkontakte	51
4.6.2	Quantitative Beschreibung der Zellkontakte	53
4.7	Vergleich der Lektin abhängigen Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von desialylierten und TNBS gekoppelten Erythrozyten durch Kupfferzellen	56
4.7.1	Ultrastrukturelle Analyse der Zellkontakte	58
4.7.2	Quantitative Beschreibung der Zellkontakte	6o
5.	Diskussion	64
5.1	Diskussion der Methoden	64
5.1.1	Isolierung der Leberzellen	64

5.1.2	Der Bindungstest	65
5.1.3	Elektronenmikroskopische Aufarbeitung des Zellmaterials	65
5.1.4	Auswahl des morphometrischen Verfahrens	66
5.2	Diskussion der Ergebnisse	67
5.2.1	Die Bindung desialylierter Erythrozyten an Kupfferzellen der Ratte	67
5.2.2	Die Bindung desialylierter Erythrozyten an Hepatozyten der Ratte	68
5.2.3	Temperatureinfluß und Effekt einer Phagozytosevorbelastung der Kupfferzellen auf die Ausbildung Lektin vermittelter Zellkontakte	69
5.2.4	Verhalten von Kupfferzellen gegenüber xenogenen Erythrozyten	71
5.2.5	Vergleich der Lektin abhängigen Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von desialylierten und TNBS gekoppelten Erythrozyten durch Kupfferzellen	74
5.2.5.1	Die Gewinnung alter Erythrozyten	74
5.2.5.2	TNBS-Markierung von Erythrozyten	75
5.2.5.3	Bindung alter Erythrozyten durch Lebermakrophagen	75
5.2.5.4	Andere Modellvorstellungen zur selektiven Phagozytose gealterter Erythrozyten	78
6.	Statistischer Anhang	8o
7.	Literaturverzeichnis	86

1. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden Zellkontakte zwischen Leberzellen der Ratte und desialylierten Ratten-Erythrozyten untersucht. Die Versuche wurden mit enzymatisch isolierten Kupfferzellen und Hepatozyten durchgeführt. Sowohl Kupfferzellen als auch Hepatozyten binden desialylierte Ratten-Erythrozyten spontan in der Kälte. Die Bindung wird über einen D-Galaktose spezifischen, lektinartigen Rezeptor auf den Leberzellen vermittelt. Während Hepatozyten in erster Linie punktförmige Kontakte mit den Spitzenbereichen ihrer Mikrovilli eingehen, bilden Kupfferzellen sowohl punktförmige als auch langstreckige Kontaktbereiche mit ihrer Zellmembran aus.
Die Bindung desialylierter Ratten-Erythrozyten an Kupfferzellen ist temperaturabhängig. Bei erhöhter Inkubationstemperatur finden sich auf Äquatorialanschnitten von Kupfferzellen mehr gebundene Erythrozyten. Die Kupfferzellen bilden ebenso wie die Erythrozyten mehr Kontaktregionen aus. Die Zahl der punktförmigen Kontakte nimmt ab, während längerstreckige Kontakte an Häufigkeit zunehmen. Durch ein morphometrisches Verfahren wurde gezeigt, daß sich sowohl die durchschnittliche Länge der Einzelkontaktstelle als auch der gesamte bindende Anteil der Makrophagenmembran bei erhöhter Inkubationstemperatur signifikant vergrößert.
Eine Phagozytosevorbelastung der Kupfferzellen mit Tusche oder Latex hat im Vergleich zu unbelasteten Kupfferzellen keinen signifikanten Einfluß auf die Temperaturabhängigkeit der Bindung und auf das Bindungsverhalten der Makrophagen. Während Hepatozyten nur asialo Schafs- oder asialo humane Erythrozyten

binden, sind Kupfferzellen zusätzlich in der Lage, auch mit nicht desialylierten fremden Erythrozyten Kontakte einzugehen. Im Vergleich zu unbehandelten humanen Erythrozyten führt die Verwendung ihrer desialylierten Formen im Bindungstest nur zu einer geringen Verstärkung der Bindung an Kupfferzellen, korrespondierende Versuche mit Schafs-Erythrozyten zeigen nach Desialylierung eine deutliche Steigerung der Bindung. Die Größe der eingesetzten Erythrozyten spielt in dem verwendeten Testsystem keine wesentliche Rolle für die Ausbildung der Zellkontakte.

Isolierte Kupfferzellen können in Serum freiem Medium signifikant in vivo gealterte von jungen Ratten-Erythrozyten unterscheiden. Alte und junge Erythrozyten wurden über einen Percoll-Dichtegradienten getrennt. Die Bindung wird duch einen Galaktose-Partikel erkennenden Rezeptor auf Kupfferzellen vermittelt. Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, daß die Bindung alter Erythrozyten an Lebermakrophagen der von asialo Erythrozyten ähnlicher ist, als jener von TNBS gekoppelten roten Blutkörperchen.

2. Einleitung

2.1 Feinbau der Leber

Die Leber ist an einer Vielzahl von Stoffwechselvorgängen beteiligt. Ihre Leistungen werden von verschiedenen Zellelementen erbracht. Es lassen sich unterscheiden:

1. Hepatozyten (parenchymatöse Zellen)
2. Sinusoidale Zellen

In der Leber der erwachsenen Ratten sind 65% der Zellen Hepatozyten.Diese repräsentieren 9o - 95% der gesamten Zellmasse. Die sinusoidalen Zellen machen etwa 3o - 35% der Zellen aus, besitzen auf Grund ihrer geringen Größe jedoch nur einen Anteil von etwa lo% an der Lebermasse (Weibel et al., 1969). Die sinusoiden Kapillaren zeigen als Stoffaustauschstrecke besondere Merkmale. Sie sind weit, wodurch es zur Strömungsverlangsamung kommt. Die äußeren Grenzflächen der Hepatozyten sind durch die Ausbildung von Mikrovilli vergrößert. Dies führt zu einer zusätzlichen Intensivierung des Kontaktes mit dem Blut. Die eigentlichen Parenchymzellen werden durch die sinusoidalen Zellen abgeschirmt. Zwischen sinusoidalen Zellen und Hepatozyten findet sich ein Spaltraum unterschiedlicher Weite, der Disse´sche Raum. Dieser enthält u.a. kollagene Fasern. Vier Arten sinusoidaler Zellen sind beschrieben worden (Wisse, 1977):

1. Kupfferzellen
2. Endothelzellen
3. Fettspeichernde Zellen
4. Pit Zellen

Die Kupfferzellen liegen den Endothelzellen auf. Teilweise finden sie sich sogar im Disse´schen Raum. Ein großer Teil ihrer Oberfläche ist normalerweise dem Blutstrom zugewandt. Die Oberfläche selbst ist von zahlreichen Pseudopodien bedeckt, die in das Lumen der Kapillare ragen. Zusammen mit dem Vorspringen des Zellkörpers in das Sinusoid wird ihnen auch eine Regulationsfunktion der Mikrozirkulation zugesprochen (Wisse, 198o). Die Form der Kupfferzelle ist hochgradig variabel, sie zeigt Morphologie und Verhalten eines Makrophagen. Innerhalb des Leberläppchens liegt die Kupfferzelle bevorzugt periportal (Wisse, 1977), aber auch im perivenösen Bereich ist sie vorhanden. Die Zellen dort zeigen eine weniger hohe endozytische und lysosomale Aktivität (Sleyster und Knook, 1982). Die Kupfferzellen sind zusammen mit den Endothelzellen die ersten Zellen, welche das vom Darm über die Vena porta kommende Blut beim Durchgang durch die Leber passiert.
Die Endothelien der Lebersinusoide zeichnen sich gegenüber anderen Gefäßendothelien durch ein Fehlen der Basallamina aus. Von ihren flachen Zelleibern gehen Fortsätze aus, die fenestriert sind. Der mittlere Porendurchmesser beträgt o,1 um (Wisse, 197o). Man spricht von Siebplatten. Die Poren gestatten dem Plasma einen freien Durchtritt in den Disse´schen Raum, sie haben Filtrationsfunktion. Das Zytoplasma der Endothelzelle ist durch eine starke Entwicklung des vakuolären Apparates gekennzeichnet (Wisse, 198o). Fettspeichernde Zellen (Ito, 1973; Tanuma und Ito, 1978) kommen nur in kleinen Zahlen vor; sie spielen evtl. eine Rolle im Metabolismus von Vitamin A. Die Pit-Zelle (Wisse et al., 1976) wird nur gelegentlich

beobachtet.
Die Untersuchungen wurden mit Hepatozyten und Kupfferzellen durchgeführt.

2.2 Funktionen der Kupfferzelle

Die Kupfferzellen gehören zum Retikulo-endothelialen System (RES) des Säugetierorganismus. Über ihre Herkunft herrscht Uneinigkeit. Von einigen Autoren werden die Kupfferzellen als lokal selbstproliferierend eingestuft (Kelley und Dobson,1971 ; Widmann und Fahimi, 1975; Volkmann, 1976; Wisse 1977, 198o). Nach anderen Befunden sind Kupfferzellen in die Leber eingewanderte mononukleäre Phagozyten (Van Furth, 1982). Sie sind im ausdifferenzierten Zustand teilungsunfähig. Bei größeren Schäden werden daher Kupfferzellen durch einen Zustrom mononukleärer Zellen aus extrahepatischen Quellen ersetzt, (Crofton et al., 1978; Diesselhoff - Den Dulk et al. 1979; Deimann und Fahimi, 1979). Die wichtigste Funktion der Kupfferzellen liegt in der Säuberung des Blutes von Fremd- bezw. unerwünschten Stoffen durch Phagozytose. Die Phagozytosefähigkeit kann durch Opsonine verstärkt werden. Opsonine können z.B. Complement-Komponenten (z.B. C3b) oder auch Antikörper sein. Rezeptoren für die Fc-Region von zellgebundenem JgG und für C3b wurden auf Kupfferzellen nachgewiesen (Munthe - Kaas, A.C., 1976; Munthe - Kaas et al., 1975; Munthe - Kaas et al., 1976). Eine unspezifische Opsonierung von zirkulierenden Partikeln erfolgt durch α_2SB Glykoprotein (Saba, 1975). Dieses ist identisch mit Plasma Fibronektin (Blumenstock et al., 1978). Neuere Befunde deuten darauf hin, daß die

opsonierende Aktivität des Fibronektins durch einen noch nicht näher charakterisierten Plasma-Co-Faktor gesteigert wird (Blumenstock et al., 1983).
Eine weitere Funktion der Kupfferzellen ist die Entfernung von Endotoxin (Praaning - van Dalen et al., 1981), welches mit dem Pfortaderblut aus dem Darmbereich in die Leber gelangt. Endotoxin ist ein normaler Bestandteil des Pfortaderblutes bei gesunden Tieren und Menschen. Die Systemische Endotoxinämie bei Patienten mit Lebererkrankungen scheint mit einem Zusammenbruch der Kupfferzell Funktion einher zu gehen (Liehr und Grün, 1977). Auch Bakterien werden schnell aus der Zirkulation entfernt (Friedman und Moon, 1977; Tamaru und Fujita, 1978). Zelltrümmer nach verschiedenartigen Traumen, wie z.B. operativen Eingriffen, Verbrennungen und Schock werden ebenso phogozytiert wie einige Arten von Tumorzellen (Roos und Dingemans, 1977). Kupfferzellen reagieren mit Viren (Gendrault et al., 1977) unter anderem auch mit einem Hepatitis Virus (Sabesin und Koff. 1974). Fibrin Spaltprodukte werden normalerweise von sinusoidalen Zellen aufgenommen (Sherman et al., 1977). Auch Fibrinaggregate werden zur Verhinderung der intravasalen Gerinnung endozytiert. In den letzten Jahren wurde auch eine Fülle von Substanzen identifiziert, die von den Lebermakrophagen sezerniert werden.

2.3 Das Galaktose - Partikel Lektin

Eine weitere Gruppe von Oberflächen-Rezeptoren, nämlich Lektine, sind in jüngster Zeit beschrieben worden.
Als Lektine bezeichnet man Proteine, die eine Affinität zu bestimmten Zuckerstrukturen aufweisen, ohne selbst eine

enzymatische Aktivität zu besitzen (Sharon und Lis, 1972; Lis und Sharon, 1973). Ursprünglich beschrieb der Begriff eine Gruppe von antikörperähnlichen pflanzlichen Samenproteinen. Diese können an die Oberfläche verschiedener Zelltypen, wie etwa Erythrozyten, binden und sie dabei agglutinieren. Inzwischen wurde der vielfache Nachweis von Lektinen in Säugetiergeweben erbracht (Ashwell und Morell, 1974; Stahl et al., 1976; Freimer et al., 1978; Ögmundsdottir et al., 1978; Czop et al., 1978; Nagamura und Kolb, 1980; Neufeld und Ashwell, 1980; Glass et al., 1981; Kolb, Friedrich und Süss, 1981). Tierlektine spielen wahrscheinlich eine Rolle in zellulären Erkennungsmechanismen. Über die Anwesenheit eines Galaktose-Partikel erkennenden Lektins auf Kupfferzellen werden widersprüchliche Angaben gemacht. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß asialo Glykoproteine von parenchymalen aber nicht von sinusoidalen Leberzellen aufgenommen werden (Ashwell und Morell, 1974; Schlesinger et al., 1978; Hubbard und Stukenbrock, 1979; Hubbard et al., 1979; Wall et al., 1980). Kolb und Kolb-Bachofen(1978)fanden indirekte Hinweise auf die Existenz eines Galaktose-spezifischen Lektins auch auf Kupfferzellen. Grundlage ihres experimentellen Systems sind Befunde, nach denen desialylierte Erythrozyten aus dem Blut durch Kupfferzellen sequestriert werden. Bei menschlichen Erythrozyten sind Sialinsäuren Komponenten von Glykolipiden und Glykoproteinen in der Außenschicht von Zellmembranen (Hubbard und Corn, 1972; Gahmberg und Hakomori, 1973). Das hauptsächliche Sialoglykoprotein ist Glycophorin. Es enthält 90% der gesamten N-Acetyl-Neuraminsäure (Platt und

Norwig, 1980). Glycophorin durchspannt die gesamte Zellmembran (Marchesi et al., 1976; Furthmayr, H. 1978). Sein Kohlenhydratanteil wird an der Zelloberfläche exponiert. Glycophorin trägt 30 - 50% der M embran Kohlenhydrate (Tanner und Anstee, 1976; Tanner et al., 1976; Gahmberg et al., 1976). Nach Abspaltung der Sialinsäure werden auf der Erythrozytenoberfläche ß - D - Galaktosylreste exponiert. Eine genaue Analyse der Bindung von asialo - Erythrozyten an Kupfferzellen wurde von Schlepper-Schäfer et al. (1980) vorgenommen. Die Zellkontakte werden durch ein Ca^{2+} abhängiges D-Galaktosyl/D-Glukosyl Erkennungssystem vermittelt. Dieses hat wahrscheinlich Proteinnatur. Die Ausbildung von Zellkontakten ist unabhängig von der ATP Bildung und der Zellmobilität. Seine Karbohydrat-Spezifität ist ähnlich der, die für ein korrespondierendes Lektin auf Hepatozyten (Stockert et al., 1977) beschrieben wurde.

Der direkte Nachweis für die Anwesenheit eines Galaktose-Partikel Rezeptors auf der Kupfferzelloberfläche wurde durch die elektronenmikroskopische Lokalisierung einer Ligandenbindung erbracht (Kolb-Bachofen et al., 1982). Auch Hepatozyten sind in der Lage, desialylierte Erythrozyten (und Lymphozyten) in vitro zu binden (Kolb, Schudt, Kolb-Bachofen und Kolb, 1978; Kolb, Kriese, Kolb-Bachofen und Kolb, 1979). Diese Bindung von desialylierten Erythrozyten an Hepatozyten ist durch Galaktose und strukturverwandte Zucker spezifisch hemmbar (Kolb, Kolb-Bachofen und Schlepper-Schäfer 1979). Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß die Bindung der asialo-Erythrozyten durch den 1974 von Ashwell auf Hepatozyten beschriebenen

Rezeptor für Asialo Glycoproteine vermittelt wird. Der Galaktose erkennende Rezeptor der Hepatozyten ist wahrscheinlich in vivo für die Homöostase des Serumglykoproteinspiegels mitverantwortlich (Ashwell und Morell, 1977).

2.4 Spezielle Fragestellung

Die Bindung und Phagozytose opsonierter Erythrozyten durch Makrophagen in vitro ist bereits früher beschrieben worden (Griffin et al., 1975; Polliack und Gordon, 1975; Munthe-Kaas et al., 1976; Kaplan ., 1977). Hierbei werden Bindung und Phagozytose der Erythrozyten von IgG oder C3 Rezeptoren auf den Makrophagen vermittelt.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die Lektin vermittelte Bindung desialylierter Erythrozyten an Rattenleberzellen in vitro untersucht.

Die Bindungscharakteristiken von Kupfferzellen und Hepatozyten wurden verglichen.Zur einfacheren lichtmikroskopischen Identifizierbarkeit der Kupfferzellen wurde in dem verwendeten Testsystem oft mit Tusche markierten Makrophagen gearbeitet (Schlepper-Schäfer et al., 198o). Damit könnte sowohl eine Aktivierung als auch eine Reduzierung der Kapazität des Galaktose-Partikel erkennenden Lektins verbunden sein. Um den Einfluß vorausgehender Phagozytose auf die Bindungsfähigkeit der Kupfferzellen zu untersuchen, wurde das Verhalten unmarkierter, Latex und Tusche vorbelasteter Lebermakrophagen verglichen. Die Größe der Bindungen wurde dazu mit Hilfe eines morphometrischen Verfahrens quantifiziert.

Endozytose ist ein stark temperaturabhängiger Prozeß, während Bindung durch Makrophagenrezeptoren auch bei niedrigen Temperaturen ablaufen kann (Kaplan und Mørland, 1978). Das Bindungsverhalten der Erythrozyten an die unterschiedlich vorbelasteten Kupfferzellen wurde auch in dieser Hinsicht untersucht. Das Verhalten der Kupfferzellen gegenüber xenogenen Erythrozyten in vitro wurde beobachtet. Erythrozyten von Mensch und Schaf wurden dazu in den Bindungstest eingesetzt. Die Lektin vermittelte Adhäsion desialylierter menschlicher und Schafs-Erythrozyten an Kupfferzellen wurde verglichen. Kupfferzellen sind wesentlich an der Elimination gealterter Erythrozyten aus der Zirkulation beteiligt (Vömel und Platt, 1982). Während des Alterungsprozesses verändert sich wahrscheinlich der Karbohydratanteil der Membranglycoconjugate. Alte Erythrozyten tragen 15% weniger Sialinsäure auf ihrer Membran als junge Erythrozyten (Yaari, 1969; Marikowski und Danon , 1969; Balduini et al., 1974; Baxter und Beeley, 1975; Cohen et al., 1976; Luner et al., 1977). Choy, Wong und Lee (1979) wiesen nach, daß in vivo gealterte Ratten-Erythrozyten einen erhöhten Anteil von Galaktoseresten auf ihrer Membran aufweisen. Diese Befunde lassen die Annahme zu, daß der Galaktose-Partikel Rezeptor auf Kupfferzellen bei der Sequestrierung alter Erythrozyten beteiligt ist. Die Bindung zwischen Kupfferzellen und alten Erythrozyten der Ratte wurde in vitro untersucht. Die Bindung wurde mit derjenigen von desialylierten Rattenerythrozyten und mit der von Trinitrobenzolsulfonsäure gekoppelten Ratten-Erythrozyten verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Abkürzungen

aq. bidest.	Aqua bidestillata
BSA	Rinderserumalbumin
C	Schnittpunkt
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GalNAc	N-acetyl-D-Galaktosamin
HuRBC	Menschliche Erythrozyten
Man	Mannose
N-HuRBC	Asialo Erythrozyten des Menschen
N-RaRBC	Asialo Ratten-Erythrozyten
N-SRBC	Asialo Schafs-Erythrozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung nach Dulbecco
RaRBC	Ratten-Erythrozyten
SRBC	Schafs-Erythrozyten
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNBS-RaRBC	TNBS gekoppelte Ratten-Erythrozyten

3.2 Verwendete Substanzen und Lösungen

Perfusionsmedium:

118.o mmol/l NaCl, 2.5 mmol/l Na_2HPO_4, 2.o mmol/l NaH_2PO_4, 6.o mmol/l KCl, 2o.o mmol/l Na HCO_3, 5o.o mmol/l Glucose, o,o28 mmol/l Phenolrot (Gibco Bio-Cult, Karlsruhe), pH 7.4. Die Osmolarität des Mediums beträgt etwa 35o mosmol

Bindungspuffer:

Modifiziertes Eagle's Medium mit Hanks Salzen ohne Natriumbicarbonat, ohne Glutamin (Flow Laboratories, Bonn) mit 1o mmol/l Natriumphosphat, pH 7.4

Kollagenase (aus Clostridium Histolyticum, Boehringer, Mannheim; o.15 U/mg, E.C. (3.4.24.4)).

Neuraminidase (aus Vibrio Cholera, Behring-Werke, Marburg, 1 U/ml, E.C. (3.2.1.18)).

Trypanblau - Lösung: Trypanblau (Gibco Bio-Cult) o,1% in o.9% NaCl

Kristallviolett - Lösung:

Kristallviolett (Serva) o.45 mg/ml in Bindungspuffer plus o.7% BSA (Behring-Werke)

Zur Markierung der Kupfferzellen:

Tusche (Pelikan, Günther Wagner, Hannover),

Latexpartikel (Bacto-Latex, Code 31o2 Difco Laboratories, Detroit, Mich.)

Natriumcitrat 3.8% (Merck, Darmstadt)

Für die Kopplung von Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) an Ratten-Erythrozyten:

Cacodylat - Puffer:

Dimethylarsinsäure - Natrium Salz (Serva, Heidelberg)
o.28 mol/l, pH 6.9

TNBS - Lösung:
2.4.6 - Trinitrobenzolsulfonsäure (Serva, Heidelberg)
12.5 mmol/l in Cacodylat - Puffer

Hanks - Hepes Puffer:
Hanks Salzlösung, ohne Na HCO_3, (Gibco) mit Hepes (N-2-Hydroxyläthyl-Piperazin - N - 2 - Äthansulfonsäure, Seromed GmbH., München) 2% (V/V).

Glycyl-Glycin-Puffer:
Glycyl-Glycin 7.57 mmol/l in Hanks-Hepes-Puffer

Für die Trennung von jungen und alten Erythrozyten:

PBS:
Phosphat gepufferte Saline nach Dulbecco,

137	mmol/l	NaCl
2.7	mmol/l	KCl
8.o	mmol/l	$Na_2 HPO_4 \times 2 H_2O$
1.5	mmol/l	$KH_2 PO_4$

Percoll - Stammlösung:
85.2 g Percoll (Polyvinylpyrrolidon überzogenes Silikat Gel, Pharmacia, Uppsala, Schweden) in 9.5 ml lofach konzentriertem PBS plus loo mg Glucose, mit aq. bidest. auf loo ml aufgefüllt, pH 7,4, 317 mosmol

Für die Einbettung des Zellmaterials:

EM - Cacodylatpuffer:
loo mmol/l Cacodylat,
loo mmol/l Saccharose
2 mmol/l Calciumchlorid, pH 7.4, Osmolarität ≈ 3oo mosmol.

Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg), 25%ige wässrige Glutaraldehydlösung;Osmiumtetroxid von Merck, Darmstadt, wird als 4%ige wässrige Osmiumtetroxid-Stammlösung angesetzt

Medium nach Spurr (1969); Substanzen von Serva, Heidelberg:

ERL - 4206

Vinylcyclohexendioxid als Epoxyharz	1o.o g

NSA

Nonenylbernsteinsäure - anhydrid	26.o g
als Härter	

DMAE, S - 1

Dimethylaminoäthanol als Beschleuniger	o.4 g

D.E.R. 736

aliphatische Diepoxide verschiedener Kettenlänge zur Erhöhung der Elastizität	6.o g

Für die Kontrastierung von Dünnschnitten:

Uranylacetatlösung:

Uranylacetat (Merck, Darmstadt)

1%ige Lösung in aq. bidest.

Bleicitratlösung

Bleicitrat (Serva, Heidelberg) o.3%ige Lösung in

0.1 mol/l NaOH

3.3 Versuchstiere

Für die Perfusion werden männliche Wistar-Ratten von 15o g Körpergewicht verwendet. Das Alter der Tiere beträgt zu diesem Zeitpunkt 7 - 8 Wochen. Die Tiere wurden während der Aufzucht mit einer handelsüblichen Standardrattendiät ad libitum

ernährt. Sie entstammen der zentralen Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf.

3.4 Isolierung und Anreicherung von Hepatozyten und Kupfferzellen

3.4.1 Das Perfusionssystem

Zur schonenden und möglichst vollständigen Gewinnung der Leberzellen wird ein enzymatisches Isolierungsverfahren mit Kollagenase angewandt (Berry und Friend, 1969).
Der Aufbau der Perfusionsapparatur erklärt sich durch das Prinzip des zirkulierenden Mediums (Abb. 1).
Durch eine Schlauchpumpe (S) wird das Medium über ein Schlauchsystem aus einem Vorratsgefäß (V) gesaugt und in einen Oxygenator (O) gepumpt. In diesem wird das Perfusionsmedium

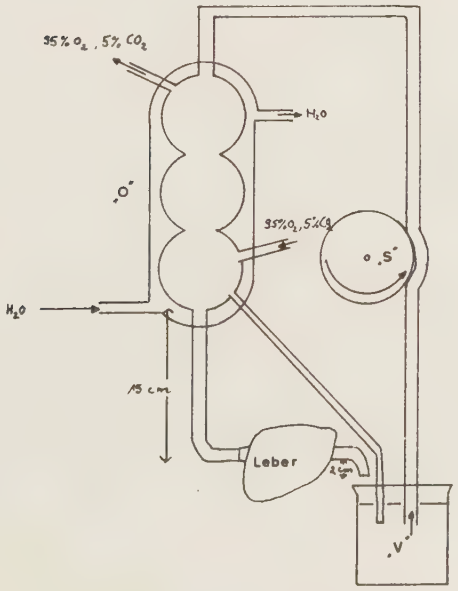

Abb. 1

Perfusionsapparatur

auf ca. 38°C erwärmt und mit Carbogengas (95% O_2, 5% CO_2) gesättigt. Die Zugabe von Carbogengas dient der Sauerstoffsättigung und pH-Stabilisierung des Perfusionspuffers. Durch den auf etwa 15 cm Wassersäule eingestellten hydrostatischen Druck fließt das Medium aus dem Oxygenator über einen Polyäthylenschlauch von der V.porta in die Leber. Es durchströmt diese über das lebereigene Venensystem und gelangt über eine in die obere Hohlvene eingeführte Kanüle in das Vorratsgefäß zurück.

3.4.2 Perfusion der Leber

Zur Vorbereitung der Perfusion werden die Tiere mit Nembutal® (Pentobarbital - Na in einer Dosierung von 7.2 mg pro loo g Körpergewicht) betäubt. Nachdem der Bauchraum eröffnet ist, wird die Leber im Bereich der Area nuda vom Zwerchfell gelöst und das Omentum minus durchtrennt. Es folgt die Ligatur des Oesophagus und seine Trennung vom Magen distal der Ligatur. Der gesamte intraperitoneal gelegene Magen-Darmtrakt kann nun zur linken Seite verschoben werden, so daß die V.porta und V.Cava inferior freiliegen. Die V.porta wird mit einem Haltefaden angeschlungen und vorsichtig quer eröffnet. Das Gefäß wird mit einem dünn ausgezogenen Polyäthylenschlauch bei laufender Perfusion kanüliert, die Kanüle mit zwei Ligaturen fixiert. Oberhalb der rechten Vena renalis wird die Vena Cava inferior abgebunden und distal der Ligatur durchtrennt. Der Thorax wird längs des Sternums und beiderseits längs der Rippenbögen eröffnet. Durch den rechten Herzvorhof wird eine Polyäthylen - Kanüle in die Vena cava superior

eingeführt. Diese ableitende Kanüle wird durch eine Ligatur gesichert. Zunächst wird die Leber im nichtzirkulierenden System für 3 Minuten mit Perfusionsmedium gespült. Anschließend wird die Leber mit o.6% Kollagenase, gelöst in Perfusionspuffer, rezirkulierend für lo - 12 Minuten perfundiert. Die Fließgeschwindigkeit des Mediums beträgt etwa 28 - 32 ml/Minute.

3.4.3 Trennung und Anreicherung von Hepatozyten und Kupfferzellen.

Nach beendeter Perfusion wird die Leber entnommen und in 8o - loo ml eiskaltes Perfusionsmedium überführt. Dort wird die Leberkapsel mit der Pinzette teilweise entfernt. Durch behutsames Ausschütteln des Gewebes erhält man ein Gemisch der verschiedenen Leberzelltypen und Gewebeverbände. Diese Suspension wird durch ein Nylongazefilter von 8o µm Porendurchmesser ohne Pressen in Zentrifugenrundbodenröhrchen aus Glas mit etwa 4o ml Fassungsvermögen filtriert. Die filtrierte Zellsuspension wird 3 Minuten lang bei $4^{o}C$ und 8 x g in einer Beckman Tischzentrifuge TJ-$_{6}$R mit Swingout-Rotor-TH-4 zentrifugiert. Nahezu alle Hepatozyten befinden sich in dem erhaltenen Sediment, während die Kupfferzellen im Überstand verbleiben. Sediment und Überstand dieses ersten Zent rifugationsschrittes werden getrennt weiter verarbeitet.

Das Hepatozytensediment wird vorsichtig in eiskaltem Perfusionspuffer resuspensiert und noch zweimal 3 Minuten bei $4^{o}C$ und 8 x g zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt erfolgt eine vorsichtige Resuspension in Perfusionspuffer. Nach Beendigung der Zentrifugationsschritte und nochmaliger

Resuspension in Perfusionspuffer wird die erhaltene Hepatozytenfraktion für 6o Minuten in Perfusionspuffer unter Carbogenbegasung auf Eis belassen. Nach dieser Zeit wird die Suspension zweimal in der oben angegebenen Weise mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen. Die Zelldichte der Suspension wird auf 2.5×10^6 Zellen/ml Bindungspuffer eingestellt.

Zur Isolierung der Kupfferzellen wird der Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes nach Hinzugabe von Bindungspuffer 5 Minuten bei $4^\circ C$ mit 100 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet besteht aus einem Kupfferzell-Hepatozyten-Gemisch. Die an Kupfferzellen reiche obere Schicht des Pellets wird in Bindungspuffer resuspensiert und 3 Minuten bei $4^\circ C$ und 8 x g zentrifugiert. Die Hepatozyten sedimentieren. Aus dem Überstand werden die Kupfferzellen durch 5 minütige Zentrifugation bei $4^\circ C$ und 100 x g pelletiert. Das erhaltene Sediment wird vorsichtig resuspensiert und 3o Minuten in eiskaltem Perfusionspuffer unter einer Carbogenatmosphäre begast. Es folgt eine 5 minütige Zentrifugation bei 100 x g. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in Bindungspuffer aufgenommen. Dabei wird die Z elldichte auf 2.5×10^6 Kupfferzellen/ml Bindungspuffer eingestellt.
Die Hepatozytenfraktion enthält über 9o% Hepatozyten.
Die Kupfferzellfraktion enthält zwischen 4o% und 6o% Kupfferzellen.

3.4.4 Lichtmikroskopische Identifizierung von Kupfferzellen und Hepatozyten

Alle aus Gewebe isolierten Zellen zeigen eine Tendenz zur Ab-

rundung. Die Hepatozyten unterscheiden sich durch ihre Größe und intensive Anfärbung mit Kristallviolett von allen anderen Leberzellen deutlich. Die Identifizierung der Kupfferzellen in ihrer Fraktion ist schwieriger als die der Hepatozyten. Es wurden drei verschiedene Typen von Kupfferzellen in den Versuchen eingesetzt:

1.) Unmarkierte Kupfferzellen

Es werden unmarkierte Kupfferzellen isoliert. Als solche werden Kupfferzellen bezeichnet, die vor der Isolierung keiner artefiziellen Phagozytosebelastung ausgesetzt wurden. In der isolierten Kupfferzellfraktion lassen sich diese Kupfferzellen von Hepatozyten eindeutig durch ihre geringere Größe und schwächere Anfärbbarkeit mit Kristallviolett unterscheiden. Die lichtmikroskopische Unterscheidung von Kupfferzellen und Endothelzellen hingegen ist schwieriger. Frisch isolierte Kupfferzellen sind jedoch etwa doppelt so groß wie Endothelzellen (Brouwer et al., 1980), etwas schwächer anfärbbar durch Kristallviolett als diese und zeigen ein stärker strukturiertes Zellinneres. Endothelzellen weisen einen deutlich mit Kristallviolett anfärbbaren, asymetrisch liegenden Kern auf, häufig ist auch die Siebplatte erkennbar. Anhand dieser Kriterien können unmarkierte Kupfferzellen mit großer Sicherheit identifiziert werden.

2.) Markierte Kupfferzellen

a) Tuschemarkierung

30 Minuten vor Beginn der Perfusion werden der Ratte 0.12 ml Tusche pro 100 g Körpergewicht in eine

Schwanzvene injiziert. Die Tusche wird vor Anwendung gegen o.9% NaCl dialysiert und 1:2 (v/v) mit o.9% NaCl verdünnt. Der mittlere Durchmesser der Carbonpartikel beträgt etwa o.o3 µm (Cotran et al., 1967). Bei der Leberpassage wird der weitaus größte Teil des Carbons von den Kupfferzellen phagozytiert. Die Endothelzellen zeigen eine signifikant geringere Aufnahme dieser relativ kleinen Partikel als Kupfferzellen. Bei Endothelzellen erfolgt die Aufnahme durch Mikropinozytose. Auch die seltenen fettspeichernden Zellen phagozytieren nicht (Widmann et al., 1972). Das große Ausmaß der Tusche-Ingestion durch Kupfferzellen läßt sie bei lichtmikroskopischer Betrachtung eindeutig hervortreten.

b) Markierung mit Latexpartikeln

3o Minuten vor Beginn der Perfusion werden o,1 ml Latexpartikel 1:3 mit o.9% NaCl Lösung verdünnt pro loo g Körpergewicht in die Schwanzvene der Ratte injiziert. Es werden Latexpartikel mit einem mittleren Durchmesser von o.8 µm verwendet. Partikel dieser Größe können nur Kupfferzellen aufnehmen (Widmann et al., 1972). Die Latexpartikel sind lichtmikroskopisch nachweisbar, so daß eine Identifizierung der Kupfferzellen mit großer Sicherheit gelingt.

3.4.5 Prüfung der Vitalität

Zur Prüfung der Vitalität werden Kupfferzellen und Hepatozyten im Volumen-Verhältnis 1 : 1 mit Trypanblau-Lösung gemischt.

Nicht vitale Zellen nehmen diesen Farbstoff auf. Sind mehr als 5% der Kupfferzellen angefärbt, so gilt die gesamte Kupfferzellfraktion als für die Durchführung von Bindungstesten ungeeignet. Der Anteil anfärbbarer Hepatozyten liegt bei 1o ± 5%. Der höhere Anteil geschädigter Zellen in der Hepatozytenfraktion ist darauf zurückzuführen, daß diese wesentlich empfindlicher gegenüber mechanischen Einflüssen als die kleineren Kupfferzellen sind. In der Kupfferzellfraktion beträgt der Anteil toter Hepatozyten ca. 2o%.

3.5 Erythrozyten

3.5.1 Gewinnung der Erythrozytensuspensionen

Die Versuche werden mit Rattenblut, Schafsblut und menschlichem Blut durchgeführt. Rattenblut wird einer Schwanzvene entnommen. Menschliches Blut wird durch Venenpunktion von einem gesunden, männlichen Spender der Blutgruppe 0 gewonnen. Zur Verhinderung der Gerinnung werden die Blutproben sofort in 3.8%igem Natriumcitrat aufgenommen. Natriumcitrat und Blut werden im Volumen-Verhältnis 1 : 1 gemischt. Schafsblut wird bereits stabilisiert von der Firma Behring, Marburg, bezogen. Alle Blutproben werden 3 mal mit loooo x g für jeweils 5 Sekunden in Bindungspuffer gewaschen. Die Zentrifugationsvorgänge werden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durchgeführt. Durch Suspensieren der Erythrozyten in Bindungspuffer werden zwei Konzentrationen zur weiteren Verwendung hergestellt:

a) 1%ige Erythrozyten (Zellzahl ca. $1o^8$/ml

b) 1o%ige Erythrozyten (Zellzahl ca. $1o^9$/ml

3.5.2 Neuraminidasebehandlung der Erythrozyten

2oo µl einer Erythrozytensuspension ($1o^9$ Zellen/ml) werden mit o.o2 Einheiten (1 U = 1 µmol/min) Neuraminidase für 3o Minuten bei 37^oC inkubiert. Zur besseren Durchmischung wird die Probe alle lo Minuten vorsichtig aufgeschüttelt. Um die Neuraminidase zu entfernen, werden die Erythrozyten in Bindungspuffer aufgenommen und mit loooo x g für 5 Sekunden zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Aus dem Erythrozytensediment wird eine 1%ige Suspension in Bindungspuffer hergestellt.

3.5.3 Kopplung von 2, 4, 6 - Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) an Ratten-Erythrozyten (RaRBC)

Die Kopplung von TNBS an Zelloberflächen geht zurück auf Rittenberg und Pratt, 1969. Einer Ratte werden 2 ml Blut entnommen und im Verhältnis 1 : 2 mit 3.8%iger Natriumcitratlösung zur Gerinnungshemmung verdünnt. Die RaRBC werden in Hanks' Hepes-Puffer aufgenommen und jeweils 2 mal für 5 Sekunden bei loooo x g zentrifugiert. Es folgt ein Waschvorgang, für den die Erythrozyten mit Cacodylat-Puffer, pH 6.9 versetzt werden. Das Medium wird nach einer Zentrifugation, 5 Sekunden bei loooo x g entfernt. Für die eigentliche Markierung werden 3o mg in Cacodylat-Puffer gelöstes TNBS pro ml Pellet tropfenweise zu o.5 ml Erythrozytenpellet gegeben. Bei Raumtemperatur wird die Probe unter Lichtabschluß und ständigem Rütteln für 3o Minuten inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (5 Sekunden bei loooo x g). Nach Absaugen des Überstandes

wird das Pellet in 5 ml Hepes gepufferter Hanks' Salzlösung aufgenommen; erneut wird die Probe, wie beschrieben, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RaRBC werden in 5 ml Glycyl-Glycin-Puffer resuspensiert und 5 Sekunden bei loooo x g gewaschen. Den Abschluß der Markierung bildet ein dreimaliger Waschvorgang der Erythrozyten in Hepes gepufferter Hanks'Salzlösung. Parallel zu diesem Arbeitsgang werden o.5 ml gepackte Erythrczyten einer Scheinbehandlung mit o.28 molarem Cacodylat-Puffer, pH 6.9 unterzogen. 3ominütige Inkubation und anschließende Waschvorgänge werden in gleicher Weise ausgeführt. Die beiden Parallelproben werden mit Bindungspuffer auf eine Zelldichte von 2 x lo^8/ml eingestellt und in Bindungsteste eingesetzt.

3.5.4 Trennung von alten und jungen Ratten-Erythrozyten auf einem Percoll-Gradienten

Eine schnelle und schonende Methode ist die Trennung der Erythrozyten über einen Percoll-Gradienten (Pertoft et al., 1978). Zwei etwa 3oo g schweren Ratten wird Blut aus der unteren Hohlvene entnommen. Durchschnittlich werden etwa 14 ml Vollblut und damit 7 ml gepackte Erythrozyten gewonnen. Zur Verhütung einer Gerinnung gibt man 1 Volumenteil Natriumcitrat zu. Das Blut wird in PBS (Dulbecco und Vogt, 1954) mit 2 mmol EDTA 3 mal für jeweils 5 Minuten bei 18oo x g gewaschen. 7 Teile Percoll-Stammlösung werden mit 3 Teilen gewaschener und gepackter Erythrozyten vorsichtig gemischt und 2o Minuten bei Raumtemperatur und 3oooo x g zentrifugiert. Nach Beendigung dieses Zentrifugationsschrittes lassen sich im oberen Drittel des

Gradienten 8 - 12 farblose Banden nachweisen, die Thrombozyten und Leukozyten enthalten. Darunter folgt eine breite Bande mit Erythrozyten. Von der Erythrozytenbande werden die oberste und unterste Fraktion abgenommen. Die untersten "flockigen" Banden werden nicht eingesetzt, da sie aggregierte Erythrozyten enthalten (Abb. 2).

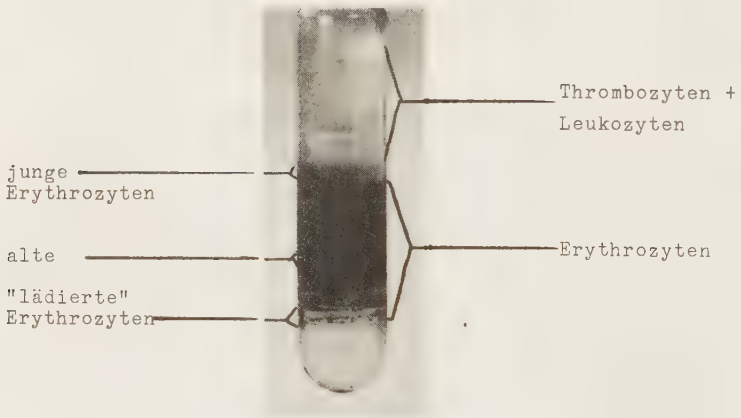

Abb. 2 Percoll-Dichtegradient zur Trennung von Blutzellen

Von der breiten Erythrozytenbande enthalten die obersten Zelllagen eine Anreicherung junger RaRBC, davon werden etwa 2oo µl mit einer abgeschnittenen Stahlkanüle abgesaugt. Die junge Fraktion wird 3 mal für 5 Sekunden bei loooo x g mit Bindungspuffer gewaschen und auf eine Zelldichte von 2 x 10^8 Zellen/ml Bindungspuffer eingestellt. 3 ml aus dem unteren Bereich der Bande werden erneut mit 7 Teilen Percoll gemischt und 2o Minuten bei 3oooo x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Mit einer Stahlkanüle werden von der untersten Erythrozytenfraktion 2oo µl abgenommen. Die Erythrozyten werden 3 mal 5 Sekunden lang bei loooo x g mit Bindungspuffer gewaschen und auf eine Endkonzentration von 2 x 10^8/ml eingestellt. In diesen Konzentrationen werden die Erythrozytensuspensionen in den Bindungstest eingesetzt.

3.6 Der Bindungstest

5o µl Kupfferzellen (2.5 x 10^6/ml) bzw. Hepatozyten (2.5 x 10^6/ml) werden mit 5o µl desialylierten Erythrozyten (1 x 10^8/ml) gemischt. Das Verhältnis Erythrozyten zu Leberzellen im Testansatz beträgt somit 4o : 1. Als Kontrolle werden Erythrozyten eingesetzt, die nicht Neuraminidase behandelt wurden. Die Proben werden bei 8o x g für 5 Minuten zentrifugiert und für eine Stunde bei 6°C inkubiert. In den Versuchen zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Ausbildung von Zellkontakten wird ein Drittel der Bindungsteste für 6o Minuten auf Eis inkubiert. Bei den anderen Testansätzen wird die Inkubation auf Eis nach 55 bzw. 45 Minuten beendet und für 5 bzw. 15 Minuten bei Raumtemperatur fortgesetzt.

Es werden Erythrozyten von Mensch, Ratte und Schaf eingesetzt. Von allen Proben werden in der Regel Mehrfachteste angesetzt. Kohlenhydrat Hemmteste werden durch 5 minütige Präinkubation der Leberzellen mit 5 µl GalNAc (o.5 mol/l) oder Mannose (o.5 mol/l) auf Eis ausgeführt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen durch vorsichtiges Schütteln resuspensiert und mit 1 Volumenteil Kristallviolett-Lösung gemischt. Die Auswertung der Proben erfolgt lichtmikroskopisch im Hämozytometer. Pro Probe werden etwa loo Leberzellen ausgewertet. Bestimmt wird der Anteil an Leberzellen, die Erythrozyten binden. Bindung wird als positiv gewertet, wenn eine Kupfferzelle 3 oder mehr Erythrozyten bzw. ein Hepatozyt lo oder mehr Erythrozyten gebunden hat ("%Bindung").

3.7 Aufarbeitung von Zellmaterial für die Elektronenmikroskopie

Die Einbettung von Zellmaterial für die Elektronenmikroskopie erfolgt nur unter der Voraussetzung, daß nach jeder Perfusion die Aktivität des Galaktose-Partikel Rezeptors auf Leberzellen erwiesen ist. Die Aktivität des Rezeptors wird in Bindungsversuchen mit Neuraminidase behandelten Ratten-Erythrozyten getestet.

3.7.1 Rosettentest für die Einbettung

Zur Rosettenbildung werden loo µl isolierte Kupfferzellen bzw. Hepatozyten (jeweils 2.5 x lo^6/ml mit loo µl Erythrozyten (1 x lo^8/ml) in einem Zentrifugenröhrchen auf Eis gemischt.

TNBS - RaRBC und angereicherte alte bzw. junge RaRBC werden in doppelter Konzentration eingesetzt. Es werden jeweils Doppelteste ausgeführt. Die Proben werden mit 8o x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend für 6o Minuten bei 6°C inkubiert. Die weiteren Einbettungsschritte werden auf Eis vorgenommen.

3.7.2 Fixierung der Rosetten

Der Überstand an Bindungspuffer wird abgesaugt und durch je loo µl EM-Cacodylat-Puffer ersetzt. Die Sedimente der Doppelteste werden zur Vermehrung des Zellmaterials in der Probe vereinigt. Die Zellsuspension wird mit EM-Cacodylat-Puffer 1 mal gewaschen (5 Minuten bei 8o x g). Fixiert werden die Proben durch 1.25% Glutaraldehyd in EM-Cacodylatpuffer auf Eis. Dazu werden die Zellen sedimentiert und 3o Minuten inkubiert. Anschließend wird das Pellet 2 mal mit kaltem EM-Cacodylat-Puffer gewaschen. Der zweite Fixationsschritt erfolgt mit Osmiumtetroxid, 1%ig in Cacodylat-Puffer 6o Minuten auf Eis. Zur Entfernung des Fixiermittels wird das Pellet 3 mal mit EM-Cacodylat Puffer überschichtet.

3.7.3 Entwässerung

Die Entwässerung der Objekte wird in einer aufsteigenden Äthanolreihe (7o%, 9o%, 96%) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Einwirkdauer beträgt jeweils 2o Minuten. Auf der letzten Entwässerungsstufe wird den Sedimenten 3 mal für jeweils 2o Minuten reines Äthanol zugegeben.

3.7.4 Einbettung der Rosetten in Spurr-Medium

Der Einbettungsprozeß wird mit einer Vierkomponentenmischung nach Spurr durchgeführt (Spurr, 1969). Diese zeichnet sich durch eine sehr niedrige Viskosität, hohe Penetrationsgeschwindigkeit, gute Schneidbarkeit und hohe Strahlstabilität aus (Preusser, 1981). Das Pellet wird auf eine 1+1 Mischung von reinem Äthanol und Spurr-Medium gegeben. Man läßt das Zellmaterial ca. 2 Stunden sedimentieren und legt das Sediment auf Spurr-Medium. Man wartet die Sedimentation ab, nach deren Ende eine vollständige Durchtränkung des Präparates mit Spurr-Medium zu erwarten ist und überführt das Pellet in Gelatinekapseln mit Spurr-Medium. Der gesamte Einbettungsprozeß wird im Abzug durchgeführt, da viele der Einzelkomponenten als Haut- oder Atemgifte eine hohe Toxizität besitzen (Preusser, 1981). Die im Spurr-Medium befindlichen Präparate werden bei 7o°C zur Polymerisation des Einbettungsmittels in einem Wärmeschrank für mindestens 4 Tage inkubiert.

3.8 Ultramikrotomie

Das in den polymerisierten Kapseln eingebettete Material wird mit Hilfe der Trimmvorrichtung TM 6o (Fa. Reichert, Wien) in Pyramidenform zugespitzt. Zur Herstellung der Ultradünnschnitte wird das Ultramikrotom Ultracut® (Fa. Reichert-Jung, Wien) benutzt. Die Präparate werden teilweise mit Glasmessern, zum überwiegenden Teil jedoch mit einem Diamantmesser (Fa. Du Pont) geschnitten. Es werden nur solche Schnitte verwendet, bei denen eine Schnittdicke zwischen 6o nm und 9o nm

erzieltwerden kann (silbergraue Farbe). Die Schnitte werden auf kupferne Trägernetze (Polaron Equipment Ltd., Watfort, England) aufgenommen.

3.9 Kontrastierung von Dünnschnitten

Die Dünnschnitte werden für 4 Minuten mit Uranylacetat nachkontrastiert. Eine zusätzliche Kontrastierung des Schnittes mit Bleicitratlösung (1 Minute) schließt sich an (Venable und Coggeshall, 1965). Bei dieser Methode besteht die Gefahr von Bleicarbonat Ausfällungen in den Dünnschnitten. Zur Verminderung der Kontamination mit dem Kohlendioxid der Atemluft wird die Kontrastierung in einem Kontrastierkasten in Anwesenheit von Natriumhydroxid ausgeführt. Nach Lufttrocknung wird die Untersuchung der Präparate mit einem Siemens Transmissions-Elektronenmikroskop (EM I A) durchgeführt. Das Mikroskop wird mit einer Beschleunigungsspannung von 8o kV betrieben.

3.1o Morphometrische Auswertung

Die photografische Dokumentation der mikroskopierten Objekte dient der Analyse des Bindungsvorganges. Um neben der beschreibenden auch eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wird ein Abbildungsmaßstab von 4ooo : 1 gewählt. Dies erlaubt unter Berücksichtigung des Plattenfilmformates von 6,5 x 9 cm in fast allen Fällen die vollständige Abbildung einer Kupfferzellrosette. Andererseits können auch intrazelluläre Strukturen erkannt werden, so daß eine Zuordnung der untersuchten Zellen zur Kupfferzellfraktion möglich ist. Bei der Nachvergrößerung

der Negative im Positivverfahren erhöht sich der Abbildungsmaßstab um den Faktor 2,2. Zur morphometrischen Analyse wird der Koordinatenraster in Form einer photografisch hergestellten Klarsichtfolie mit Meßsystem benutzt. Die Abstände der Gitterlinien auf der Meßfolie betragen 3 mm. Der Koordinatenraster wird allseitig überragend auf das auszuwertende Bild gelegt. Die Zellmembranen von Kupfferzellen und Erythrozyten stellen sich als Grenzlinien dar. Man bestimmt die Schnittpunktzahl C der Grenzlinie einer Zelle mit den Gitterlinien des Rasters. Auch die Berührung einer Meßlinie gilt als Schnittpunkt. Die Zahl C der Schnittpunkte wird zunächst getrennt für die waagerechten (C_w) und senkrechten (C_s) Gitterlinien bestimmt. Aus diesen Werten wird die Summe $C_w+C_s = C$ gebildet. Durch Abzählen der Schnittpunkte mit der Membran hat man eine Längenbestimmung durchgeführt.

Im Einzelnen werden die Membranlängen der Kupfferzellen sowie die Längen der einzelnen Bindungsstellen ausgedrückt als Zahl der Schnittpunkte C mit dem Testraster ermittelt. Um eine Aussage über die gesamte bindende Membranlänge der einzelnen Kupfferzelle machen zu können, wird die Gesamtzahl der Schnittpunkte ihrer Bindungen addiert und auf die Zahl der Schnittpunkte der Kupfferzellmembran bezogen. Eine Größenangabe erfolgt als bindende Membranlänge der Kupfferzelle in Prozent.

Es werden nur Kupfferzellen mit Äquatorialanschnitten berücksichtigt; die Zellen müssen vollständig abgebildet sein. Sie dürfen keine Zeichen der Nekrose zeigen und müssen eindeutig zu identifizieren sein. Bedingt durch den Abstand der Rasterlinien kann es vorkommen, daß punktförmige und kleine Zell-

kontaktregionen keinen Schnittpunkt mit dem Raster aufweisen. Solche Kontakte werden als mit einem Schnittpunkt (1 C) ausgestattet, gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Erkennung desialylierter Erythrozyten der Ratte durch Kupfferzellen und Hepatozyten

Frisch isolierte Kupfferzellen wie auch Hepatozyten binden desialylierte Erythrozyten spontan in der Kälte. Die Bindung wird über einen D-Galaktose erkennenden Rezeptor auf Leberzellen vermittelt.

Da die desialylierten Zellen im Überschuß zugegeben werden, erhält man lichtmikroskopisch das Bild einer Rosette (Abb.3). Als Kontrolle zur Spezifität der Zellbindung werden Inhibitionsexperimente mit N-Acetyl-D-Galactosamin (GalNAc) durchgeführt.

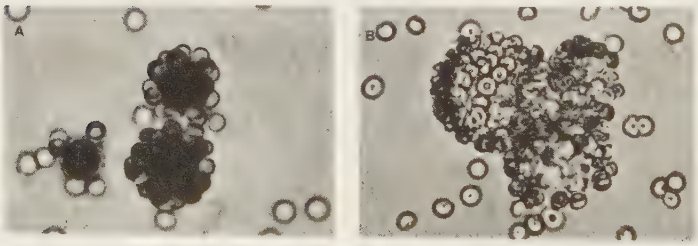

Abb. 3 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellkontakten zwischen Leberzellen und desialylierten Ratten-Erythrozyten

Die Zellen wurden im Bindungstest gemischt und bei 6°C für 6o Min. inkubiert. Hellfeld-Mikroskopie (7oo x) ohne Anfärbung.
Die Kupfferzellen erscheinen schwarz durch phagozytierte Tuschepartikel.
(A) Kupfferzellen mit desialylierten Erythrozyten
(B) Hepatozyten mit desialylierten Erythrozyten

Im Hämozytometer wird der Prozentsatz Rosetten bildener Hepatozyten bzw. Kupfferzellen ausgezählt (Tab. 1).
Unbehandelte Ratten-Erythrozyten werden nur in sehr geringem Ausmaß von Kupfferzellen oder Hepatozyten gebunden.

Tab. 1

Bindung desialylierter Erythrozyten (N-RaRBC) an Kupfferzellen und Hepatozyten

Erythrozyten	% Rosetten bildende Zellen (±SA)	
	Kupfferzellen	Hepatozyten
N-RaRBC	79.5 ± 6.4	71.5 ± 8.3
N-RaRBC + GalNAc	4.o ± 2.4	3.6 ± 2.1
RaRBC	5.5 ± 4.o	7.o ± 4.1

Kupfferzellen und Hepatozyten werden für fünf Minuten auf Eis mit 25 mmol N-Acetyl-D-Galactosamin (GalNAc) vorinkubiert. Danach erfolgt die Zugabe der Erythrozyten.
Die Daten sind der Mittelwert aus 3 Versuchen, SA: Standardabweichung

4.2 Kupfferzellmorphologie

Die Kupfferzelle zeigt Morphologie und Verhalten eines Makrophagen (Abb.4 A). Isolierte Kupfferzellen sind in der Grundform abgerundet. Im Gegensatz zur Hepatozytenfraktion, in der nach Collagenase Perfusion noch ganze Leberzellbälkchen erhalten sein können, liegen die Kupfferzellen bis auf wenige Ausnahmen immer als Einzelzellen vor. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt lo µm (Drochmans et al., 1977). Die Kupfferzelle kann durch ihren reich entwickelten lysosomalen Apparat von den anderen Zelltypen

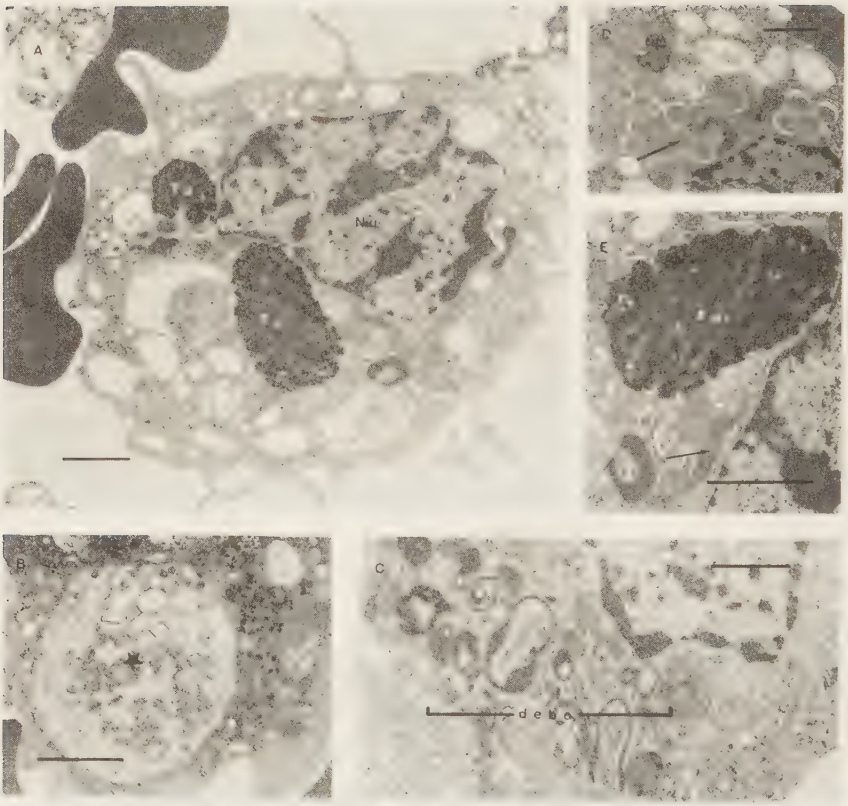

Abb. 4 Kupfferzellmorphologie

(A) Die Kupfferzelle trägt zahlreiche Pseudopodien an ihrer Oberfläche, ihr Zytoplasma wird durch einen reich entwickelten lysosomalen Apparat gekennzeichnet, 13ooo x .

(B) Lucent vacuole (✱) 17ooo x .

(C) Gruppenweise in Kernnähe (Nu) angeordnete dense bodies (debo) 15ooo x .

(D) Latex Partikel (Pfeil), obwohl in Gruppen angeordnet, ist jede Partikel von einer eigenen Membran umschlossen, 11ooo x .

(E) Großes Tusche Phagosom (Tu), einzelne Carbonpartikel sind zu erkennen; länglich geformte, in der Nähe des Kernes lokalisierte Mitochondrien (Pfeil), 21ooo x .

Die Balkenlängen entsprechen jeweils 1 µm.

des Sinusoids unterschieden werden (Abb. 4A). Es finden sich zwei Hauptformen von Vakuolen, so wie sie auch für Kupfferzellen in situ beschrieben werden (Wisse, 1974). Der erste Typ, die sog. "lucent vacuoles" zeigen einen elektronendurchlässigen Inhalt (Abb.4B). Ihre Größe kann die des Zellkernes übertreffen. Als Inhalte finden sich meist amorphe Substanzen mit granulären Bestandteilen. Die zweite Form wird durch die in großer Zahl vorkommenden "dense bodies" repräsentiert (Abb. 4C). Diese sind meist deutlich kleiner als die elektronendurchlässigen Vakuolen. "Dense bodies" liegen überwiegend gruppenweise in Kernnähe und Zellzentrum (Wisse, 1974). Daneben gibt es auch noch sehr große Vakuolen, die sogar Zellen in verschiedenen Verdauungsstadien enthalten können. Die Mitrochondrien sind länglich geformt und meist gruppenweise in Kernnähe angeordnet (Abb. 4E). Der Golgi Apparat ist gewöhnlich im Zellzentrum zu finden. Das rauhe endoplasmatische Retikulum verteilt sich im gesamten Plasmabereich. Die Kupfferzelle besitzt nur einen Zellkern. Dieser ist nicht segmentiert, doch die Kernmembran zeigt oft charakteristische kantige Einziehungen (Abb. 4A). Wie in "Material und Methoden" beschrieben, erfolgt die Auswertung der Bindungsteste in einem Hämozytometer. Zur schnelleren lichtmikroskopischen Identifizierung wurden die Kupfferzellen in den meisten Versuchen markiert. Latex Partikel mit einem Durchmesser von o.8 um werden nur von Kupfferzellen phagozytiert (Widmann et al., 1972). Relativ kleine Partikel, wie Carbon (o.o2 - o.o5 µm) werden von den Peroxidase positiven Kupfferzellen in signifikant größerer Menge als von den Peroxidase negativen Endothelzellen aufgenommen (Widmann et.al. 1972).

Neben der bereits beschriebenen Kupfferzellmorphologie sind damit zusätzliche Unterscheidungskriterien von anderen nicht parenchymatösen Zellen auch auf elektronenmikroskopischem Niveau gegeben. Deutlich sind die Latex Partikel als meist längsovale Einschlüsse in Phagosomen der Kupfferzelle zu erkennen. Ihre Struktur erscheint elektronendicht (Abb. 4D). Ein die Latex Partikel evtl. umgebender heller Hof ist durch Schrumpfungsprozesse bedingt (Ackerman und Douglas, 1980).
Carbon wird in den Kupfferzellen von Phagosomen unterschiedlicher Größe gespeichert. Diese liegen gewöhnlich in der Nähe des Zellkernes (Abb. 4E). Phagolysosomen mit Carbon konnten nur selten beobachtet werden.

4.3 Ultrastrukturelle Analyse der Zellkontakte zwischen Kupfferzellen und desialylierten Ratten-Erythrozyten

Frisch isolierte Rattenerythrozyten haben die Form bikokaver Scheiben. Ihre Behandlung mit Neuraminidase führt zu keiner lichtmikroskopischen oder elektronenoptischen Strukturveränderung.
Die Ultrastruktur der Kontaktregionen zwischen Kupfferzellen und desialylierten Ratten-Erythrozyten wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Dabei wurden nur Äquatorialschnitte der Kupfferzellen in die Auswertung einbezogen.
Auf solchen Schnitten finden sich gewöhnlich mehrere N-RaRBC, die von einer einzelnen Kupfferzelle gebunden werden (Abb. 5A). Offenbar kann die isolierte, in Suspension schwebende Kupfferzelle mit allen Abschnitten ihrer Oberfläche Asialo-Erythrozyten binden. Zellkontakte im kernnahen Bereich finden sich ebenso wie in der Zellperipherie (Abb. 5B+C).
Die Kupfferzelloberfläche ist außerordentlich vielgestaltig

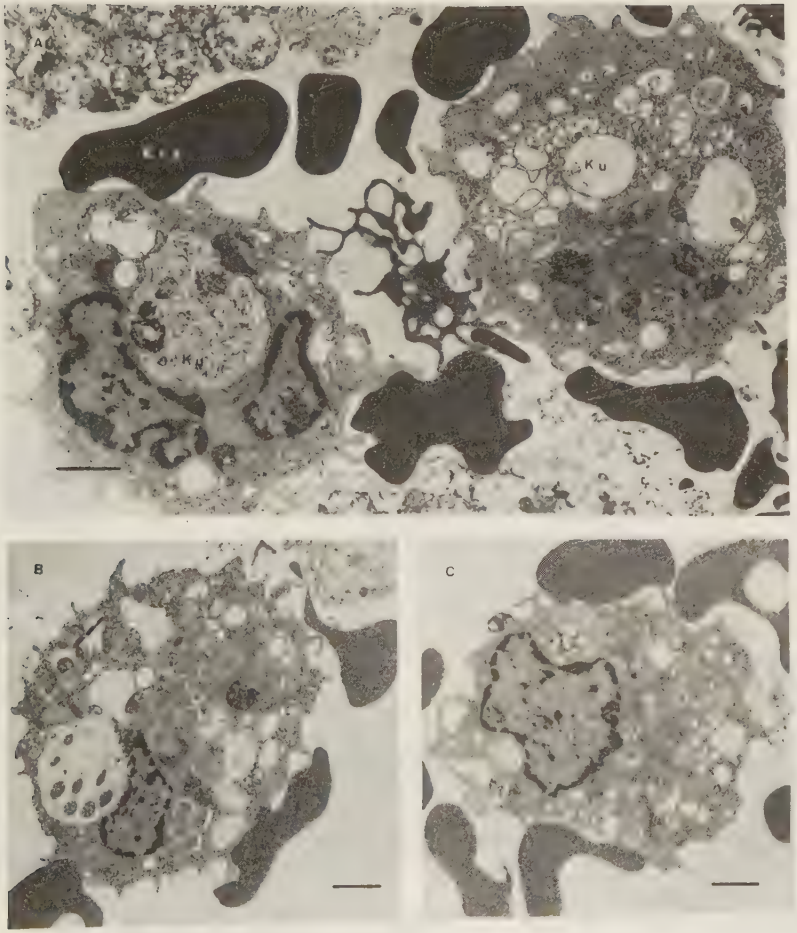

Abb. 5 Bindung desialylierter Ratten-Erythrozyten an Kupfferzellen

(A) Auf Äquatorialanschnitten von Kupfferzellen (Ku) finden sich gewöhnlich mehrere Erythrozyten (Ery), die von einer einzelnen Kupfferzelle gebunden werden, 12ooo x .

(B,C) Bindung findet sich sowohl an kernnahen, wie an peripheren Anteilen der Zelloberfläche, 9ooo x .

Die Balkenlängen entsprechen jeweils 1 µm.

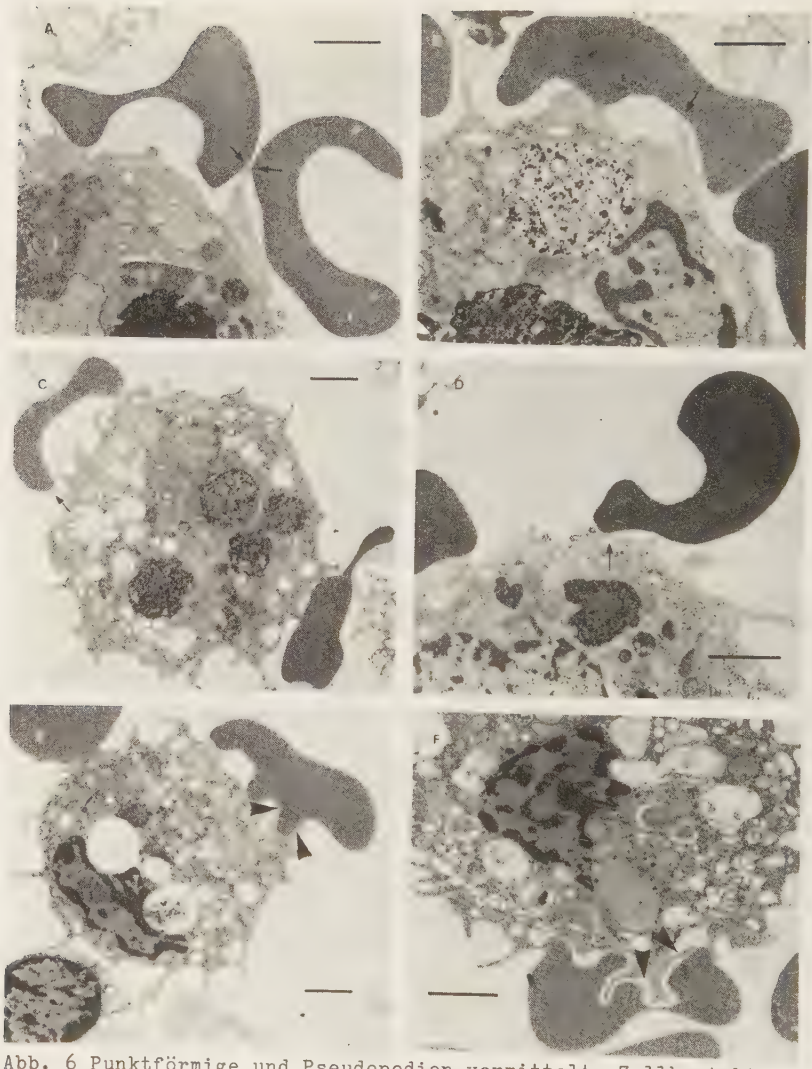

Abb. 6 Punktförmige und Pseudopodien vermittelte Zellkontakte

Art und Ausmaß der Bindung von desialylierten Ratten-Erythrozyten an Kupfferzellen variieren stark.
(A,B,C) Punktförmige Zellkontakte (Pfeile) finden sich häufig an Pseudopodien.
(D) Punktförmige Bindungen (Pfeil) finden sich auch an relativ glatten Anteilen der Kupfferzelloberfläche.
(E,F) Pseudopodien können mit ausgedehnten Oberflächenanteilen (Pfeilköpfe) an Kontakten beteiligt sein.
Vergrößerungen: (C,E) 9000 x; (A,F) 13000 x; (B,D) 14000 x .
Die Balkenlängen entsprechen jeweils 1 µm.

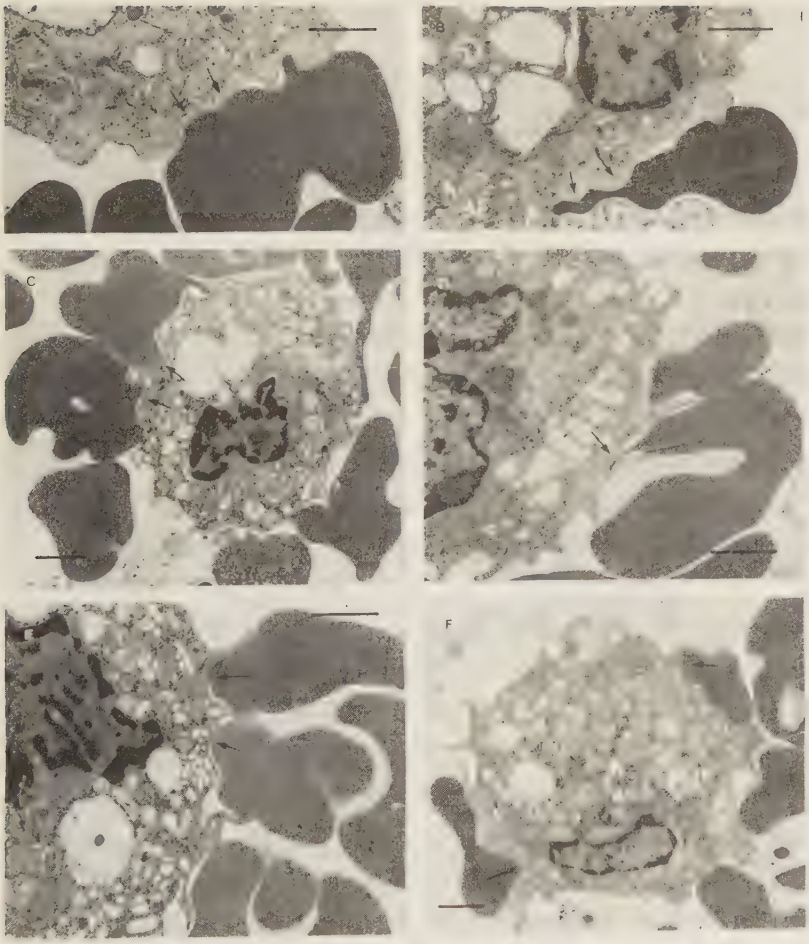

Abb.7 Flächenkontakte zwischen desialylierten Ratten-Erythrozyten und Kupfferzellen

(A) Die Bindung zwischen Kupfferzellen und Erythrozyten kann so eng sein, daß sich nur bei senkrechtem Anschnitt ein Zwischenraum (Pfeile) zeigt.

(B,C) Gelegentlich stellen die zytoplasmatischen Projektionen der Kupfferzellen (Pfeile) das exakte Spiegelbild gebundener Erythrozyten dar.

(D) Auch Erythrozyten können lange zytoplasmatische Ausziehungen (Pfeil) im Sinne einer Deformation aufweisen.

(E,F) In Fällen ausgeprägten Zellkontaktes "umgreift" (Pfeile) die Kupfferzelle den Erythrozyten mit Pseudopodien.

Vergrößerungen: (C,F) 9ooo x; (A,B,D,E) 13ooo x .
Die Balkenlängen entsprechen jeweils 1 µm.

geformt. Relativ glatte Membrananteile wechseln mit in Durchmesser und Länge variablen zytoplasmatischen Ausläufern, den sogenannten Pseudopodien. Pseudopodien enthalten keine Organellen (Wisse, 1974). Art und Ausmaß der Bindung variieren stark. So findet man Erythrozyten, die nur von einem einzelnen Pseudopodium gebunden werden. Der Kontakt kann dabei punktförmig an der Spitze des Pseudopodiums ausgebildet sein (Abb. 6A,B,C) oder breitere Oberflächenanteile der Pseudopodien mit einbeziehen (Abb. 6E,F). Auch die ebenen, konkaven und konvexen Oberflächen der Lebermakrophagen besitzen die Fähigkeit zur Bindung. Wie für Pseudopodien beschrieben, so finden sich von punktförmigen (Abb. 6D) bis zu ausgedehnten Flächenkontakten alle Übergangsformen (Abb. 7A,B). Die Zellmembran und der angrenzende Zytoplasmabereich der Kupfferzelle zeigt an Kontaktzonen keine Unterschiede zu anderen Oberflächenanteilen. Der Erythrozyt kann an mehreren Stellen gleichzeitig gebunden werden. Je nach Ausmaß der Bindung und Schnittebene werden bis zu 5 Kontaktstellen in den transmissionselektronenmikroskopischen Bildern gefunden. Die Bindung ist mit einem Prozeß gegenseitiger Formanpassung verbunden. Gelegentlich stellen die zytoplasmatischen Projektionen der Kupfferzellen das exakte Spiegelbild gebundener Erythrozyten dar (Abb. 7B,C). Andererseits können N-RaRBC lange zytoplasmatische Ausziehungen im Sinne einer Deformation aufweisen (Abb. 7D). In Fällen ausgeprägten Zell-Zell Kontaktes "umgreift" die Kupfferzelle den Erythrozyten mit Pseudopodien. Gleichzeitig kann der Bindungsbereich leicht invaginiert erscheinen (Abb. 7E,F). Dies kann als Initialschritt einer Phagozytose

aufgefaßt werden. Wie erwartet wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch keine vollständige Phagozytose von N-RaRBC durch isolierte Kupfferzellen beobachtet.

4.4 Analyse der Zellkontakte zwischen isolierten Hepatozyten und desialylierten Ratten-Erythrozyten

Frisch isolierte Hepatozyten zeigen in Suspension eine sphärische Form. Die Zellen liegen meist als 2'er oder 3'er Gruppen vor. Elektronenmikroskopisch sind größere Zellaggregate jedoch selten. Durch Phasenkontrastmikroskopie konnte der Durchmesser isolierter Hepatozyten mit 24 bis 3o um bestimmt werden (Doolittle et al., 1981). Ihr Zytoplasma enthält Mitochondrien mit intakten Cristae, Glykogen, ein reich entwickeltes rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum und Golgi Komplexe. Gelegentlich stellen sich Fetttröpfchen dar. In einem hohen Prozentsatz sind die Hepatozyten zweikernig. Die Kerne sind arm an Heterochromatin. Die Oberfläche der Hepatozyten ist durch Mikrovilli (Abb. 8 A) gekennzeichnet. Diese sind besonders häufig und groß im Bereich des ehemaligen Disse'schen Raumes. Nur vereinzelt finden sich Mikrovilli in Membranabschnitten, die in situ Kontaktzonen zwischen den Hepatozyten entsprachen. Kurze Mikrovilli werden den Bereichen früherer Gallekanälchen zugeordnet (Kolb-Bachofen, 1981). Diese Zellpolarität läßt sich allerdings nicht bei allen Hepatozyten feststellen. Viele Paranchymzellen zeigen in der vorliegenden Schnittebene homogen verteilte Mikrovilli auf ihrer Oberfläche. Membranspezialisierungen wie tight junctions oder Desmosomen fanden sich bei isolierten Zellen nicht mehr.
Isolierte Hepatozyten binden desialylierte Ratten-Erythrozyten

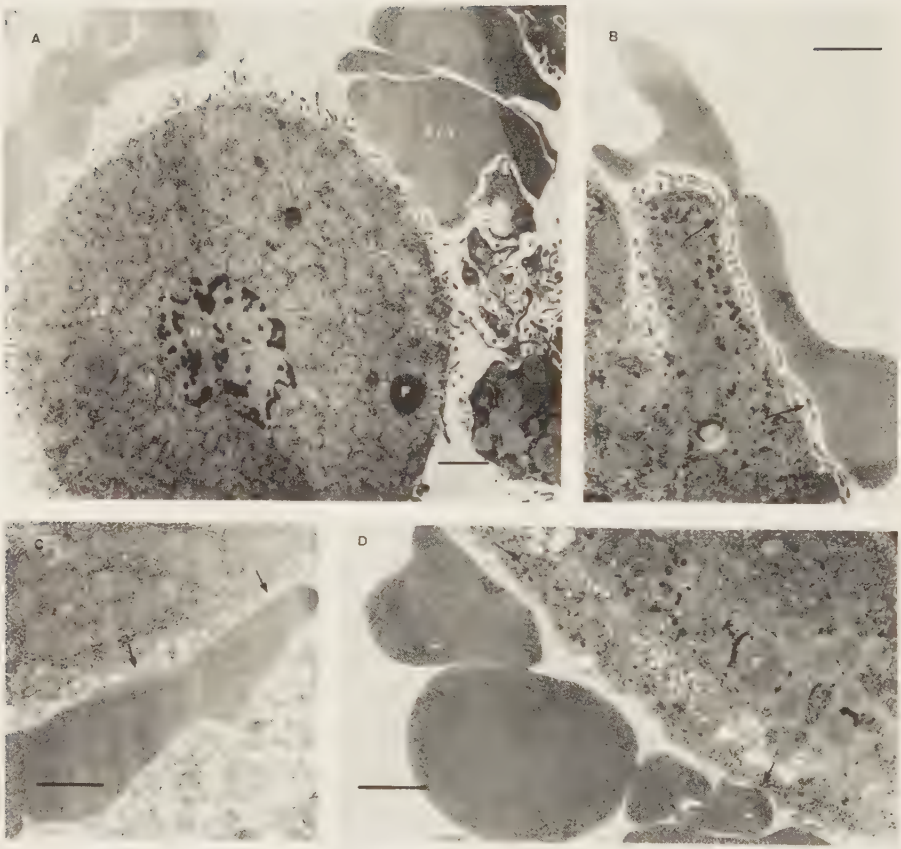

Abb. 8 Bindung desialylierter Ratten-Erythrozyten an Hepatozyten

(A) Hepatozyt, dessen Oberfläche nahezu uniform von Mikrovilli bedeckt ist.
Nu: Kern, F: Fetttröpfchen. Die Zelle hat Kontakt zu 2 Erythrozyten, 9ooo x .

(B) Isolierte Hepatozyten binden desialylierte Ratten-Erythrozyten über Mikrovilli (Pfeile), 13ooo x .

(C) Auch seitliche Anteile von Mikrovilli (Pfeile) haben die Fähigkeit zur Bindung, 13ooo x .

(D) In seltenen Fällen kann der Erythrozyt auch Kontakt mit der Hepatozytenmembran an der Basis der Mikrovilli (Pfeil) zeigen, 13ooo x .

Die Balkenlängen entsprechen jeweils 1 um.

über Mikrovilli (Abb. 8 B). Meist handelt es sich um punktförmige Kontakte an der Spitze der Villi. In Fällen intensiveren Zellkontaktes zeigen die Mikrovilli auch an ihren seitlichen Oberflächen die Fähigkeit zur Bindung (Abb. 8C). Dabei kann der Erythrozyt auch Kontakt zu der Hepatozytenmembran an der Basis der Mikrovilli besitzen (Abb. 8D). Breite Kontaktzonen wie bei Kupfferzellen ließen sich aber nicht nachweisen.

4.5 Temperatureinfluß und Einfluß der Phagozytosevorbelastung von Kupfferzellen auf die Ausbildung Lektin vermittelter Zellkontakte

Die Bildung von Zellkontakten zwischen desialylierten Erythrozyten und Kupfferzellen der Ratte unter dem Einfluß verschiedener Temperaturen und verschiedener Phagozytosevorbelastung der Kupfferzellen wurde beobachtet. Wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben, werden dazu frisch isolierte Kupfferzellen mit desialylierten Erythrozyten gemischt. Nach einer Zentrifugation, welche die Kollisionsrate zwischen den Zellen erhöht, wird ein Drittel der Bindungsteste für 6o Minuten auf Eis inkubiert. Bei den anderen Testansätzen wird die Inkubation auf Eis nach 55 bzw. 45 Minuten beendet und für 5 bzw. 15 Minuten bei Raumtemperatur fortgesetzt. Anschließend werden die Zellgemische für die Elektronenmikroskopie präpariert.
Die Versuche wurden mit unmarkierten, "naiven" Kupfferzellen, Latex markierten Kupfferzellen und Tusche beladenen Lebermakrophagen durchgeführt. Ausgewertet wurden je ein Versuch, bei Tuschemarkierung zwei Versuche ("Tusche (1)" bzw. "Tusche (2)").

Zur Methode der Kupfferzellmarkierung siehe 3.4.4 .

4.5.1 Quantitative Beschreibung der Zellkontakte

Für jeden der vier Versuche wurde am Ultradünnschnitt der durchschnittliche Anteil der bindenden Kupfferzelloberfläche bestimmt (Tab.2). Lektin vermittelte Bindung besteht auch bei sehr niedriger Inkubationstemperatur. Ein Vergleich der Kupfferzellpräparationen bei 6o minütiger Inkubation auf Eis zeigt leichte Unterschiede im Ausmaß mit dem die Makrophagenoberfläche Asialo-Ratten-Erythrozyten bindet. Während unmarkierte Kupfferzellen mit 6.9% ihrer Membran binden, binden Tusche vorbelastete Zellen des Versuches 2 mit nur 4.1% ihrer Oberfläche. Es ist also bei Tusche vorbelasteten Kupfferzellen eine leichte Tendenz zu verringerter Bindung feststellbar.

Tab. 2

Bindung von asialo-Ratten-Erythrozyten;
Einfluß der Phagozytosevorbelastung und Temperatur
auf den Anteil der bindenden Kupfferzellmembran

Markierung der Kupfferzellen	Bindende Membranlänge pro Kupfferzelle (%±SA)			
	Inkubationsperiode bei Raumtemperatur			
	o Min	5 Min	15 Min	
Keine	6.9±5.8	1o.4±8.7	18.3±9.7	$p < o.ool^+$
Latex	6.6± 4.3	7.2±6.o	22.1±1o.3	$p < o.ool^+$
Tusche (1)	5.5±5.5	1o.3±6.1 $p < o.ol^+$	11.1±6.7	$p < o.ol^+$
Tusche (2)	4.1±2.4	5.5±3.8	7.7±3.6	$p < o.ool^+$

+Im t-Test signif. Unterschied im Vergleich zum korrespondierenden o Min Wert. Über die Anzahl der pro Bindungstest ausgewerteten Makrophagen orientiert die Tab.12 im statistischen Anhang

15 minütige Erwärmung der Teste auf Raumtemperatur führt zu einer signifikanten Vergrößerung des bindenden Anteils der Makrophagenmembran; bei unmarkierten und Latex markierten Kupfferzellen erhöht sich das am Schnitt ausgemessene Membranareal 2.7fach bzw. 3.3fach, bei Tusche vorbelasteten Zellen 2.ofach (Tusche 1) bzw. 1.9fach (Tusche 2). Der Anteil der bindenden Kupfferzellmembran ist also temperaturabhängig. Tusche markierte Makrophagen reagieren aber weniger intensiv auf eine Erwärmung.

Der Anteil der bindenden Kupfferzellmembran kann von der Anzahl gebundener Erythrozyten, der Anzahl der Bindungsstellen und deren Größe abhängen. Die Bestimmung der Anzahl der auf Äquatorialanschnitten von Kupfferzellen gebundenen Erythrozyten (Tab. 3) zeigt bei 6o minütiger Inkubation auf Eis geringfügige Unterschiede zwischen den verschieden vorbelasteten Makrophagen. Die Werte reichen von 1.9 gebundenen N-RaRBC bei Tusche belasteten bis zu 2.6 Erythrozyten bei naiven Kupfferzellen. Mit zunehmender Dauer der Erwärmung werden auch mehr Erythrozyten gebunden. 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur führt zu einer Erhöhung der Anzahl gebundener Erythrozyten; bei unmarkierten und Latex markierten Kupfferzellen um 38% bzw. 71%, bei Tusche markierten nur um ca. 15%.

Tab. 3

Einfluß der Phagozytosevorbelastung und Temperatur auf die Anzahl gebundener asialo-Ratten-Erythrozyten pro Kupfferzelle

Markierung der Kupfferzellen	Gebundene N-RaRBC pro Kupfferzelle			
	Inkubationsperiode bei Raumtemperatur			
	o Min	5 Min	15 Min	
Keine	2.6±1.5	2.8±1.8	3.6±1.6	$p < o.ol^{+}$
Latex	2.1±1.o	1.8±o.8	3.6±1.4	$p < o.ool^{+}$
Tusche (1)	1.9±1.1	2.4±1.5	2.2±o.9	n.s.
Tusche (2)	1.9±o.9	1.7±1.o	2.1±o.9	n.s.

$^{+}$Im t-Test signif. Unterschied im Vergleich zu dem korrespondierenden o Min Wert
(n.s.) nicht signifikant

Erythrozyten können an mehreren Stellen ihrer Oberfläche gebunden sein. Die Zahl der Bindungen pro Kupfferzelle hängt sowohl von der Anzahl gebundener Erythrozyten als auch von deren jeweiliger Bindungsanzahl ab. Auch die Bindungsanzahl pro Kupfferzelle spiegelt die Abhängigkeit des Bindungsvorganges von der Inkubationstemperatur wieder (siehe Tab. 13 im Anhang).
Trennt man die Erythrozyten nach Zahl ihrer Bindungsstellen und vergleicht die Versuche unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen, so ergibt sich, daß nach 6o minütiger Inkubation auf Eis Erythrozyten mit nur einer Bindungsstelle bei einem Anteil von 7o% in allen Präparationen am häufigsten sind. Werden die Rosetten für 15 Minuten erwärmt so resultiert eine Verschiebung der Erythrozytenverteilung zu solchen Zellen mit 2 oder mehr Kontakten. Dieses Verhalten ist unabhängig von der Kupfferzellvorbehandlung. Genaue Daten sind der Tab.14 im Anhang zu entnehmen. Exemplarisch wird dieses Ergebnis für unbelastete Lebermakrophagen graphisch dargestellt (Abb. 9).

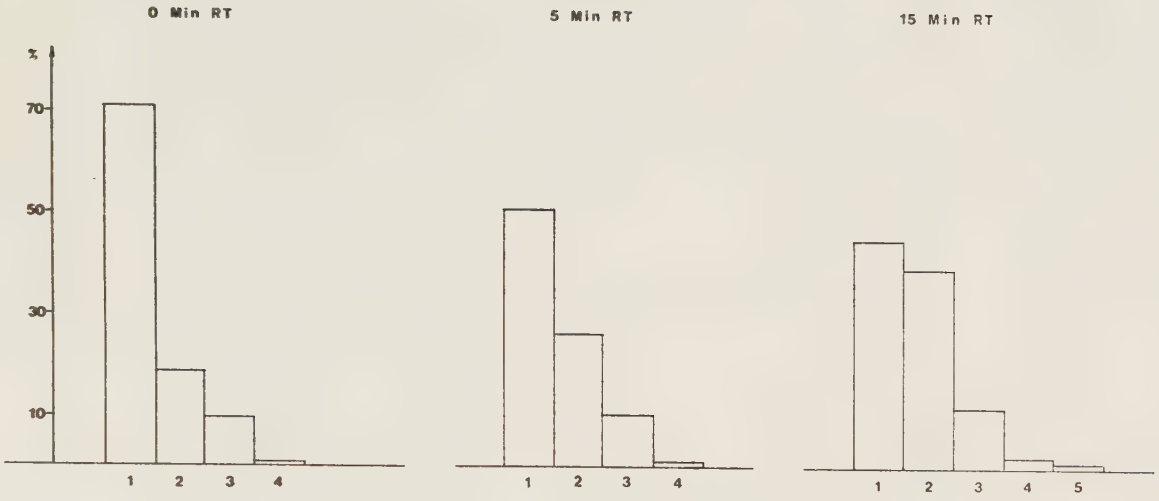

Abb. 9 : Bindung desialylierter Ratten-Erythrozyten an unmarkierte Kupfferzellen

Abszisse : Zahl der Bindungsstellen pro Erythrozyt

Ordinate : Prozentualer Anteil der Erythrozyten mit (1 - 5) Bindungsstellen

Galaktose exponierende Strukturen sind offensichtlich an vielen Stellen der Erythrozytenmembran vorhanden.

An einer Kupfferzelle finden sich punktförmige und langstreckige Kontaktstellen nebeneinander. Ein Vergleich der unterschiedlich vor belasteten Kupfferzellen nach 6o minütiger Inkubation auf Eis zeigt außer in einem Fall Tusche markierter Makrophagen nur geringe Unterschiede in der Häufigkeit von Punktkontakten (Tab.4).

Tab. 4

Bindung von Asialo-Ratten-Erythrozyten; Einfluß der Phagozytosevorbelastung und Temperatur auf den prozentualen Anteil der Punktbindungen an der Bindungszahl

Markierung der Kupfferzellen	Anteil der Punktbindungen an der Bindungszahl(%)		
	Inkubationsperiode bei Raumtemperatur		
	o Min	5 Min	15 Min
Keine	38.1	18.5	2o.5
Latex	41.o	43.9	2o.8
Tusche (1)	36.8	19.1	16.1
Tusche (2)	54.3	4o.o	4o.7

Während sonst ca. 4o% aller Bindungen Punktbindungen sind, liegt ihr Anteil im zweiten Versuch mit Tusche markierten Lebermakrophagen bei ca. 54%. 15 minütige Erwärmung der Rosettenteste führt zu einer deutlichen Abnahme der relativen Häufigkeit von Punktbindungen. Entsprechend gilt, daß langstreckige Kontakte gegenüber punktförmigen bei ausreichender Erwärmung an Häufigkeit zunehmen. Dies könnte als Hinweis auf eine Umwandlung von punktförmigen Initialkontakten in größere Bindungsstellen aufgefaßt werden.

Das Verhalten der Bindungsstellen wurde durch die Bestimmung der mittleren Bindungslänge pro Kupfferzelle untersucht (Tab. 5).

Tab. 5

Bindung von asialo-Ratten-Erythrozyten; Einfluß der Phagozytosevorbelastung und der Temperatur auf die durchschnittliche Länge der Bindung

Markierung der Kupfferzellen	Länge der einzelnen Kontaktstelle pro Kupfferzelle				
	Inkubationsperiode bei Raumtemperatur				
	o Min	5 Min		15 Min	
Keine	2.1±o.7	2.8±1.2	$p < o.ol^+$	3.5±1.1	$p < o.ool^+$
Latex	2.5±1.3	2.7±2.o		3.9±1.2	$p < o.ool^+$
Tusche	2.3±1.2	4.o±1.9	$p < o.ool^+$	4.2±2.8	$p < o.ool^+$
Tusche (2)	2.o±1.6	2.7±1.4		2.5±1.o	n.s.

$^+$Im t-Test signif. Unterschied im Vergleich zu dem korrespondierenden o Min Wert
(n.s.) nicht signifikant
Die Werte werden als Mittelwert ± SA in C (Schnittpunktzahl) angegeben

Die mittlere Länge der Einzelbindung unterscheidet sich nach 6o minütiger Inkubation auf Eis nur geringfägig innerhalb der Zellpräparationen. Tusche (2) markierte Lebermakrophagen bilden mit durchschnittlich 2 C die kleinsten Bindungen aus, während Latex Belastete mit 2.5 C die größten Bindungsstellen besitzen. Ein signifikanter Einfluß der Phagozytosevorbelastung auf die Bindungsgröße läßt sich aber nicht nachweisen. 5 und 15 minütige Erwärmung führt in allen Testen zu einer Vergrößerung der Kontaktlinie. Nach 15 Min Inkubation bei Raumtemperatur vergrößert sich

die Bindungslänge in den Präparationen unmarkierter, Latex markierter und Tusche(1) belasteter Kupfferzellen signifikant um 67%, 56% und 83%. Auch im zweiten Versuch mit Tusche gekennzeichneten Makrophagen erhöht sich die mittlere Länge der Bindungsstellen noch um 25%.
Morphologisch finden sich nach Erwärmung besonders viele Zellkontakte, bei denen die Erythrozyten partiell von Pseudopodien umgeben sind.

4.6 Zellkontakte zwischen Kupfferzellen und xenogenen Erythrozyten

Wie in "Material und Methoden" beschrieben, werden Erythrozyten vom Schaf (SRBC) und von einem menschlichen Spender der Blutgruppe 0 (HuRBC) isoliert, teilweise desialyliert (N-SRBC und N-HuRBC) und in den Bindungstest eingesetzt. Kupfferzellen und Erythrozyten werden für 6o Min bei 6°C inkubiert. Analog zu den Versuchen mit Ratten-Erythrozyten wird die Ausbildung von Zellkontakten untersucht (Tab. 6)

Tab. 6

Zellkontakte zwischen Leberzellen und xenogenen Erythrozyten (Lichtmikroskopische Auswertung)

Erythrozyten	% Rosetten bildende Zellen (± SA)	
	Kupfferzellen	Hepatozyten
HuRBC	95 ± 3	-
N-HuRBC	94 ± 3	58 ± 1o
SRBC	92 ± 5	-
N-SRBC	86 ± 6	72 ± 11
N-RaRBC	8o ± 6	72 ± 8

Daten für die Bindung humaner und Schafserythrozyten nach Vogt,1981
Die Daten sind das Mittel aus 2 - 5 Versuchen

Während Hepatozyten nur desialylierte fremde Erythrozyten binden, sind Kupfferzellen in der Lage auch nicht desialylierte fremde Erythrozyten zu erkennen. Bei den elektronenmikroskopisch ausgewerteten Bindungstesten bildeten 93% der Kupfferzellen Rosetten mit HuRBC und 78% mit N-HuRBC. Rosettenbildung mit SRBC ließ sich bei 6o% und mit N-SRBC bei 7o% der Kupfferzellen nachweisen.

4.6.1 Ultrastruktur der Zellkontakte

Frisch isolierte SRBC sind runde diskusförmige Scheiben mit zentraler Konkavität und homogenem Zellinneren. Basierend auf Messungen an rasterelektronenmikroskopischen Bildern konnten Marikovsky und Weinstein (1981) den mittleren Durchmesser Glutaraldehyd fixierter SRBC mit 3.8o µm ± o.59 (±SA) bestimmen. Die Versuche wurden mit gelagerten Schafs-Erythrozyten durchgeführt. Dadurch veränderte sich ein großer Teil der Zellen in Sphäroechinozyten. In diesen Fällen zeigt die Zellmembran typische zipfelige Ausziehungen (Abb.1o,C,D). Sialidase Behandlung der SRBC verändert die Erythrozytenmorphologie nicht. SRBC haben mit 67 μm^2 (Brain et al., 1971) annähernd nur die Hälfte der Oberfläche menschlicher Erythrozyten, die etwa 138 μm^2 (Canham und Burton, 1968) beträgt. Die frisch isolierten humanen Erythrozyten stellen sich auf Schnittbildern als Korrelate bikonkaver Scheiben dar. Ihr mittlerer Durchmesser ist mit 8.o7 µm (Canham und Burton, 1968) deutlich größer als derjenige der Schafs-Erythrozyten. Auch die roten Blutkörperchen des Menschen sind kernlos und weisen ein opakes Zellinneres auf. Desialylierung führt nicht zu anatomischen Veränderungen.

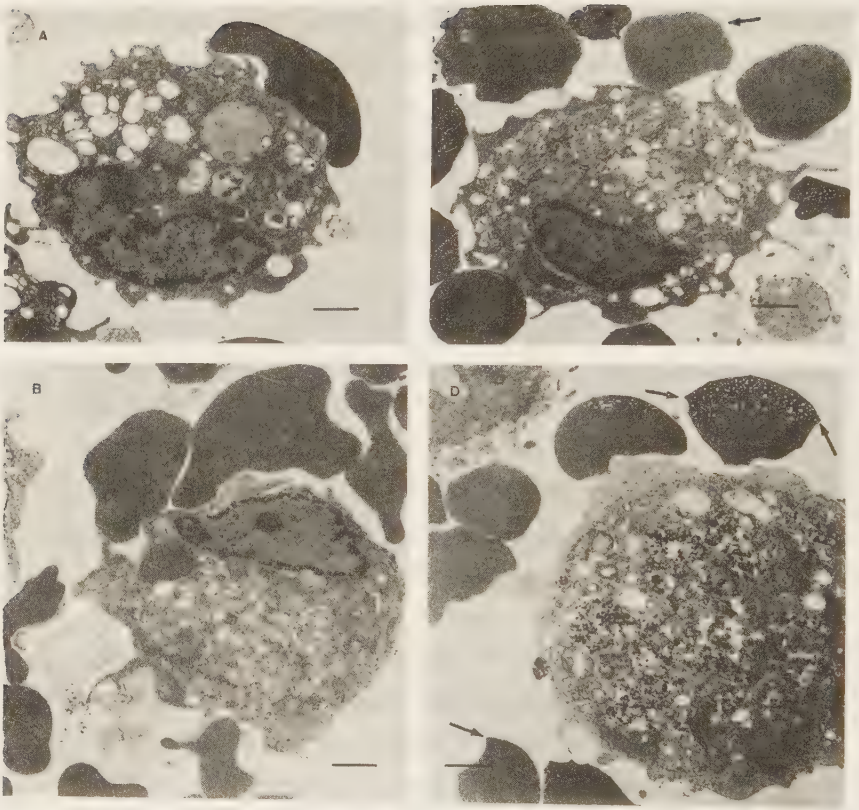

Abb. 1o Bindung xenogener Erythrozyten an Kupfferzellen

(A) Bindung eines unbehandelten humanen Erythrozyten an eine Kupfferzelle, 9ooo x .

(B) Bindung desialylierter humaner Erythrozyten an eine Kupfferzelle, 9ooo x . Desialylierung hat keinen Einfluß auf die Morphologie der Erythrozyten. Humane Erythrozyten sind größer als Schafs-Erythrozyten (C und D).

(C,D) Schafs-Erythrozyten zeigen eine meist abgerundete Form mit typischen zipfeligen Membranausziehungen (Pfeile), 9ooo x .

Die Balkenlängen entsprechen jeweils 1 µm.

Die Versuche wurden mit unmarkierten, Latex und Tusche vorbelasteten Lebermakrophagen durchgeführt. Ausgewertet wurde jeweils ein Versuch. Die Bindung selbst gleicht der von asialo Ratten-Erythrozyten. Sie wird durch die unterschiedliche Struktur der Erythrozyten modifiziert (Abb. 1o, A,B,C,D)

4.6.2 Quantitative Beschreibung der Zellkontakte

Für jeden der 5 Versuche wurde am Ultradünnschnitt der durchschnittliche Anteil der bindenden Kupfferzellmembran bestimmt Tab.7).

Tab. 7

Einfluß der Phagozytosevorbelastung und der Erythrozytenart auf den Anteil der bindenden Kupfferzellmembran

Erythrozyten	Bindende Membranlänge pro Kupfferzelle (% ± SA)		
	Markierung der Kupfferzellen		
	Keine	Latex	Tusche
HuRBC	14.9±9.2 p < o.ool+	13.2±1o.2 p<o.ool+	14.5±8.7 p<o.ool+
N-HuRBC	15.o± 9.6	13.8±9.2	15.3±1o.1
SRBC	6.2±4.8	5.5±4.5	5.3±3.9
N-SRBC	7.8±5.8	7.8±5.7	1o.1±7.2 p<o.ool+
N-RaRBC	7.9±6.o	8.o±6.2	11.o±9.2

+Im t-Test signif. Unterschied gegenüber den korrespondierenden Werten für SRBC.
Die Stichprobenumfänge der Versuche werden in Tab. 15 des Anhanges angegeben.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen (6o Min bei 6°C) binden die unterschiedlich vorbelasteten Kupfferzellen Schafserythrozyten

mit 5.3% bis 6.2% ihrer Zellmembranlänge. Werden humane Erythrozyten in den Bindungstest eingesetzt, so ist der bindende Anteil der Kupfferzellmembran zwei- bis dreimal so groß. Bei Tusche belasteten Makrophagen ist der Unterschied in der Erkennung von HuRBC und SRBC am größten.

Sialidase Einwirkung auf menschliche Erythrozyten führt nur zu einer geringen Ausweitung der bindenden Membran um 5% bis 7%. Im Gegensatz dazu vergrößert sich die an Bindungen beteiligte Makrophagenmembran deutlich, wenn hier anstatt unbehandelter, desialylierte Schafs-Erythrozyten eingesetzt werden. Die Zunahme beträgt für unmarkierte Kupfferzellen 26%, für Latex und für Tusche markierte Kupfferzellen 42% bzw. 91%. Tusche vorbelastete Makrophagen binden sowohl asialo HuRBC als auch asialo SRBC unter den Kupfferzellpräparationen am intensivsten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Resultaten der Versuche mit Erhöhung der Inkubationstemperatur (vergl.Tab.2). Hier zeigen Tusche vorbelastete Kupfferzellen eine Tendenz zu verringerter Bindung. Die Größe der bindenden Makrophagenmembran entspricht bei asialo Schafs-Erythrozyten in etwa der von asialo Ratten-Erythrozyten.

Die Länge der einzelnen Bindungsstellen ist weitgehend unabhängig von den Erythrozytendimensionen (Tab.8).

Die Oberfläche humaner RBC (138 μm^2) ist ca. 100% größer als die von SRBC (67 μm^2). Trotzdem sind die Kontakte mit menschlichen Erythrozyten bei unmarkierten, Latex und Tusche markierten Lebermakrophagen nur um 54%, 59% bzw. 24% größer als die mit Schafs-Erythrozyten. Die Bindungslängen von asialo Ratten-Erythrozyten entsprechen denen von asialo Schafs-Erythrozyten, Ratten-Erythrozyten lassen sich in ihrer Größe aber zwischen HuRBC und SRBC einordnen.

Tab. 8

Einfluß der Phagozytosevorbelastung und der Erythrozytenart auf die Länge der Bindungsstellen

Erythrozyten	Länge der einzelnen Kontaktstelle pro Kupfferzelle		
	Markierung der Kupfferzellen mit		
	Keine	Latex	Tusche
HuRBC	3.7±1.4 p<o.ool+	3.5±1.8 p<o.ool+	2.6±o.9
N-HuRBC	3.1±1.2	3.8±3.o	4.o±2.9
SRBC	2.4±1.o	2.2±1.1	2.1±1.1
N-SRBC	2.8±1.2	2.5±1.1	3.1±2.1
N-RaRBC	2.6±1.6	2.4±1.o	3.1±1.6

+Im t-Test signif. Unterschied im Vergleich zu den korrespondierenden Werten für SRBC.
Die Daten werden als Mittelwert ± SA in C (Schnittpunktzahl) angegeben.

Unbelastete Kupfferzellen bilden sowohl mit unbehandelten HuRBC als auch mit SRBC die ausgedehntesten Kontakte. Die desialylierten Formen werden von Tusche vorbelasteten Makrophagen über die größten Flächen gebunden.

Der größere Anteil bindender Membran der Lebermakrophagen bei Inkubation mit menschlichen Erythrozyten erklärt sich nicht durch die im Durchschnitt größere Einzelkontaktstelle sondern auch durch die höhere Zahl dieser gebundenen Erythrozyten (Tab.16 im statistischen Anhang). Menschliche RBC werden in allen Kupfferzellpräparationen in höherer Zahl erkannt als Schafs-Erythrozyten. Sialidase Behandlung führt im Falle der HuRBC zu einem geringen,

im Falle der SRBC zu einem deutlichen Anstieg gebundener Erythrozyten. So binden unmarkierte 25%, Latex markierte 31% und Tusche markierte Kupfferzellen 53% mehr asialo SRBC als deren nicht desialylierte Form. Desialylierte Ratten-Erythrozyten werden in ähnlicher Zahl gebunden wie desialylierte Schafs-Erythrozyten. Auch für die Anzahl gebundener roter Blutkörperchen scheint deren Größe nicht von Bedeutung zu sein. Dies gilt um so mehr als alle getesteten Erythrozytenarten in großem Überschuß zu den Kupfferzellen gegeben wurden. Die Größe eines Erythrozyten ist jedoch wichtig für die Anzahl der Bindungen, die er eingehen kann. Der humane Erythrozyt kann über eine doppelt so große Distanz mit dem Makrophagen in Beziehung treten wie der kleinere Schafs-Erythrozyt. Entsprechend erhöht ist der Anteil menschlicher Erythrozyten mit zwei und drei Bindungsstellen. Sialidase Behandlung verschiebt das Verteilungsprofil menschlicher und Schafs-Erythrozyten nur geringfügig zu Zellen mit höherer Kontaktzahl.Genaue Daten werden in der Tab. 17 des Anhanges angegeben. Die Art der Phagozytosevorbelastung von Kupfferzellen hat keinen eindeutigen Einfluß auf dieses Resultat.

4.7 Vergleich der Lektin abhängigen Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von desialylierten und TNBS gekoppelten Erythrozyten durch Kupfferzellen.

Alte und junge Ratten-Erythrozyten werden auf einem Percoll Gradienten getrennt. Die Desialylierung und die TNBS Markierung der Erythrozyten werden wie beschrieben durchgeführt (siehe 3.5.3 und 3.5.4).

Tusche markierte Kupfferzellen und Erythrozyten werden im Bindungstest bei 6°C für 6o Minuten inkubiert. Als Rosetten gelten Kupfferzellen, welche wenigstens 3 Erythrozyten gebunden haben. Die Auswertung erfolgt in einem Hämozytometer.

Tab.9

Vergleich der Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von asialo und TNBS markierten Erythrozyten durch Kupfferzellen in vitro (lichtmikroskopische Auswertung)

Erythrozyten	Rosetten bildende Kupfferzellen %
"Alte"	57.5 ± 4.7
"Junge"	32.6 ± 2.9
RaRBC	5.5 ± 4.o
TNBS-RaRBC	31.8 ± 1o.6
TNBS-scheinbehandelte RaRBC	11.o ± 6.o
N-RaRBC	8o.o ± 3.o

Die Werte für die Versuche mit alten und jungen Erythrozyten sind der Arbeit von Schlepper-Schäfer et al., 198o, entnommen.
Die Daten sind Mittelwerte aus 2 - 5 Versuchen.

In vivo gealterte Ratten-Erythrozyten binden spontan an frisch isolierte Lebermakrophagen (Tab.9). Die Daten zeigen, daß Kupfferzellen signifikant alte Erythrozyten von jungen oder frisch isolierten Erythrozyten in Serum freien Medium unterscheiden können. Als Kontrolle werden Inhibitionsteste mit GalNAc 25 mmol

durchgeführt. In den Versuchen mit alten RaRBC resultiert eine Hemmung der Zellkontakte von 53.6 ± 17.o% .
Auch TNBS markierte Erythrozyten bilden Rosetten mit Lebermakrophagen, wenn sie in den Bindungstest eingesetzt werden.

4.7.1 Ultrastrukturelle Analyse der Zellkontakte

Durch Trennung der Erythrozyten auf einem Percoll Gradienten erhält man Anreicherungen alter und junger Zellen. Die Erythrozyten beider Fraktionen zeigen keine morphologischen Besonderheiten (Abb. 11, A, B). Anatomische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Fragmentation, lassen sich als Auslöser der Erkennung durch Kupfferzellen weitgehend ausschließen. Die Membranen der Erythrozyten wiesen keine Zeichen einer Percoll induzierten Veränderung auf; es ließ sich auch kein Percoll auf den Zelloberflächen nachweisen. Auch desialylierte und TNBS-gekoppelte RaRBC sind im elektronenoptischen Bild nicht von frisch isolierten roten Blutkörperchen zu unterscheiden (Abb.11,C,D).
Die Bindungen selbst zeigten die gleichen Charakteristika, wie es für diejenigen mit asialo Erythrozyten beschrieben wurde. Vergleiche hierzu 4.3
In Suspension befindliche Lebermakrophagen können mit ihrer gesamten Oberfläche binden. Es finden sich sowohl Punktkontakte als auch Flächenkontakte unterschiedlicher Größe. Phagozytose ist unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar

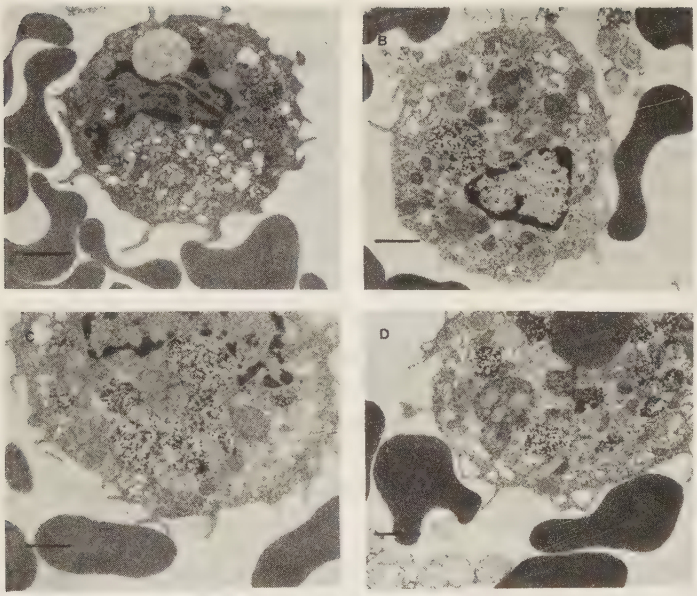

Abb. 11

(A) Inkubation von Kupfferzellen mit jungen Erythrozyten. Nur vereinzelt findet sich ein Kontakt, 9ooo x .

(B) Bindung alter Erythrozyten an Kupfferzellen, 9ooo x . Die Erythrozyten aus den Fraktionen alter und junger Zellen unterscheiden sich morphologisch nicht.

(C,D) Bindung TNBS-markierter Erythrozyten an Kupfferzellen, 9ooo x .

Die Balkenlängen entsprechen jeweils 1 µm.

4.7.2 Quantitative Beschreibung der Zellkontakte

Für die verschiedenen Erythrozytenpräparationen wurde am Ultradünnschnitt der durchschnittliche Anteil der bindenden Kupfferzellmembran bestimmt (Tab. 1o). Zuvor wurden die Lebermakrophagen in situ einer Phagozytosebelastung mit Tusche unterzogen.

Tab. 1o

Vergleich der Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von asialo und TNBS markierten Erythrozyten durch Kupfferzellen in vitro; durchschnittlicher Anteil der bindenden Kupfferzellmembran.

Erythrozyten	Bindende Membranlänge pro Kupfferzelle % ± SA
Alte RaRBC	5.3 ± 4.7
Junge RaRBC	3.o ± 2.6
TNBS-RaRBC	7.6 ± 4.5
N-RaRBC	11.o ± 9.2

Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SA)
Über die Anzahl der pro Bindungstest ausgewerteten Kupfferzellen orientiert die Tab. 18 im Anhang.

Bei Einsatz von jungen Erythrozyten in den Bindungstest sind durchschnittlich nur 3% der Makrophagenmembran an Bindungen beteiligt. Die bindende Kupfferzellmembran vergrößert sich um 77% wenn alte Erythrozyten eingesetzt werden. Diese Zunahme ist allerdings wegen der großen Schwankungsbreite des Mittelwertes nicht signifikant. Den längsten bindenden Membrananteil zeigen die Kupfferzellen mit asialo Erythrozyten. Gegenüber Testen mit

jungen, alten und TNBS gekoppelten roten Blutkörperchen ist der bindende Membrananteil der Kupfferzellen um 267 %, 1o8% und 45% vermehrt.

Vergleicht man die mittlere Länge der Kontaktzonen pro Kupfferzelle (Tab. 11), so zeigt sich, daß asialo und TNBS-Erythrozyten gleich große Bindungen aufweisen. Erwartungsgemäß sind die Kontaktregionen bei Einsatz junger Erythrozyten in den Bindungstest kleiner als bei Verwendung alter RaRBC. Alte Erythrozyten werden über durchschnittlich 26% größere Kontakte gebunden. Wegen der hohen Standardabweichung ist allerdings auch dieser Unterschied nicht als signifikant zu bewerten.

Tab. 11

Vergleich der Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von asialo und TNBS markierten Erythrozyten durch Kupfferzellen in vitro; durchschnittliche Länge der Bindungsstellen

Erythrozyten	Länge der einzelnen Kontaktstelle pro Kupferzelle
Alte RaRBC	2.4 ± 1.1
Junge RaRBC	1.9 ± o.8
N-RaRBC	3.1 ± 2.5
TNBS-RaRBC	3.1 ± 2.5

Die Wertangabe erfolgt in C (Schnittpunktzahl mit den Linien des Koordinatenrasters) als Mittelwert ± SA

Trotz gleich großer Bindungen erklärt sich die um 45% größere bindende Kupfferzellmembran bei Verwendung Neuraminidase

behandelter RaRBC gegenüber TNBS-RaRBC durch die erhöhte Zahl gebundener Erythrozyten und Bindungen. So binden 24% mehr desialylierte Erythrozyten als TNBS-Gekoppelte. In Zelladhäsionstesten mit N-RaRBC werden auch 25% mehr Kontakte als in solchen mit TNBS-RaRBC gebildet.

Auch alte Erythrozyten werden in größerer Zahl gebunden als junge (21%), die Zahl der Bindungen liegt um 29% höher. Genaue Daten sind der Tab. 19 im statistischen Anhang zu entnehmen.

Rote Blutkörperchen können mehrere Kontaktstellen besitzen. Innerhalb der Gruppe der asialo Erythrozyten weist die Mehrzahl der Zellen nur eine Bindungsstelle auf. Auch 75% aller jungen und 73.8% aller alten roten Blutzellen werden auf Schnittbildern nur an einer Stelle gebunden. Im Gegensatz dazu ist die Häufigkeit von TNBS-RaRBC mit 1 und 2 Bindungsstellen nach Adhäsion an Tusche markierte Kupfferzellen etwa gleich groß.

Das Ergebnis der Erythrozyteneinteilung nach Zahl ihrer Kontaktregionen wird in Abb. 12 dargestellt.

Insgesamt betrachtet sind die Bindungscharakteristika alter Erythrozyten denen von asialo Erythrozyten ähnlicher als jenen von TNBS gekoppelten roten Blutkörperchen.

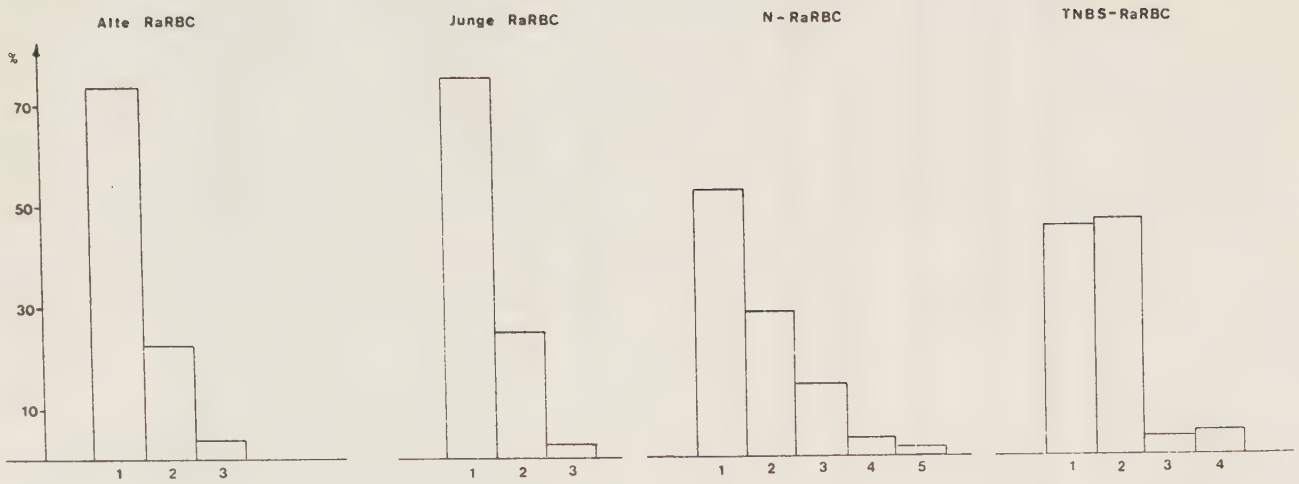

Abb. 12 : Vergleich der Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Bindung von asialo und TNBS markierten Erythrozyten an Tusche markierte Kupfferzellen in vitro

Abszisse : Zahl der Bindungsstellen pro Erythrozyt

Ordinate : Prozentualer Anteil der Erythrozyten mit (1-5) Bindungsstellen

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Isolierung der Leberzellen

Mechanische Methoden zur Isolation der Leberzellen führen im allgemeinen nur zu einer geringen Ausbeute an vitalen Zellen (Branster und Morton, 1957; Tsai et al., 1966; Gardner und Kay, 1967; Lipson et al., 1969; Morley und Kingdon, 1972). Daher wurden zunehmend enzymatische Methoden zur Zellisolierung entwickelt. Durch Verwendung proteolytischer Enzyme (z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Pronase oder Pepsin) wird die Leber in eine Art eingekapselte Zellsuspension überführt. Hierbei werden allerdings in starkem Maße Zellmembranen zerstört (Longmuir und Rees, 1956; Laws und Strickland, 1961; Seglen, 1976). Ein hoher Anteil vitaler Leberzellen kann erzielt werden, wenn die Enzyme Kollagenase und Hyaluronidase zum Abbau der interzellulären Matrix verwendet werden (Howard et al., 1967). Später erwiesen sich Methoden, bei denen die Leber zunächst mit einem Calcium freien Medium und anschließend rezyklierend mit Collagenase perfundiert wird, als die bislang schonendsten zur Erlangung repräsentativer Leberzellpräparationen (Howard und Pesch, 1968; Berry und Friend, 1969; Seglen, 1972; Schreiber und Schreiber, 1973; Kolb und Adam, 1976). Sowohl für die Gewinnung von Kupfferzellen wie auch von Hepatozyten stellt also die enzymatische Isolierung mit Collagenase ein geeignetes Verfahren dar.

5.1.2 Der Bindungstest

Die Bindung desialylierter Erythrozyten an einem Galaktose-Partikel erkennenden Rezeptor auf Kupfferzellen ist ausführlich beschrieben worden (Kolb und Kolb-Bachofen, 1978; Schlepper-Schäfer et al., 1980).
Auch Hepatozyten binden desialylierte Erythrozyten mittels eines Galaktose spezifischen Rezeptors (Kolb, Schudt, Kolb-Bachofen und Kolb, 1978; Kolb, Kolb-Bachofen und Schlepper-Schäfer, 1979). Dabei handelt es sich um den von Ashwell 1974 beschriebenen hepatischen Asialoglycoprotein Rezeptor.
Durch die Zentrifugation der Proben wird die Kollisionsrate zwischen den Zellen erhöht. Die Bindung selbst ist aber unabhängig von einer Zentrifugation, da sich auch ohne Zentrifugation eine Rosettenbildung beobachten läßt (Osburg, 1980).

5.1.3 Elektronenmikroskopische Aufarbeitung des Zellmaterials

Während der Leberzellgewinnung, der Fixierung und Einbettung der Rosetten können Veränderungen eintreten, welche Fehlinterpretationen nach sich ziehen. So können bei Fixieren und Einbetten Schrumpfungs- und Quellungsvorgänge auftreten, die das Volumen der Zellen verändern. Da reproduzierbare Resultate erlangt werden sollen, die nach Sitte (1967) nicht in allen Fällen fehlerfrei sein können, werden genaue Angaben zur Methodik vorgelegt. Wie bereits erwähnt, wurden nur optimal erhaltene Objektbereiche in die Auswertung einbezogen.

5.1.4 Auswahl des morphometrischen Verfahrens

Die morphometrische Meßmethode mußte der Eigenart des Objektes angepaßt sein. Hierbei war die Anordnung der Strukturen im Objekt ebenso zu berücksichtigen, wie das Verhältnis Objektdurchmesser : Bilddurchmesser. Sind die Strukturen in dem Objekt wahllos verteilt, so spricht man von gleichmäßigen Objekten. Sie enthalten Grenzflächen in allen räumlichen Lagen (Sitte, 1967). Ein Beispiel hierfür sind die in Suspension liegenden, idealisiert kugelförmigen Kupfferzellen mit ihr en Bindungsstellen. Im Gegensatz dazu stehen ausgerichtete Objekte, wie z.B. Nerven, Muskeln und Sehnen. Hier sind alle interessierenden Grenzflächen parallel zu einer Achse ausgerichtet. Da die typische Kupfferzell-Rosette das Bildfeld bei 4ooo-facher Vergrößerung nicht überragt, kann man von einem begrenzten Objekt sprechen. Für diese Objektklasse werden zur Analyse unbegrenzte Linien oder Punktsysteme empfohlen, die das Objekt allseitig überragen (Hennig, 1957; 1958; Sitte, 1967).
Ein solches Liniensystem ist der in der vorliegenden Arbeit verwendete Koordinatenraster. Dieser ist besonders gut zum Ausmessen begrenzter, gleichmäßiger biologischer Objekte geeignet (Sitte, 1967). Die durchschnittlich bindende Membranlänge pro Kupfferzelle wurde als Relativwert angegeben. Um die Kupfferzellgröße als Bezugsgröße konstant zu halten, wurden nur solche Lebermakrophagen berücksichtigt, die Äquatorialanschnitte zeigten. Hierbei sind wesentlich weniger Fehlerquellen zu beachten als bei der Ermittlung von Absolutwerten. Schneide- und Präparationsartefakte (Schnittstauchung,

Volumenänderung beim Fixieren und Einbetten sowie fehlerhafte Vergrößerungsangaben) verfälschen Relativwerte im allgemeinen nicht (Sitte, 1967). Eine Angabe als Absolutwert erfolgte für die durchschnittliche Länge der Bindungsstelle pro Kupfferzelle.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Die Bindung desialylierter Erythrozyten an Kupfferzellen der Ratte

In der vorliegenden Arbeit wird die Bindung desialylierter Ratten-Erythrozyten an frisch isolierte Kupfferzellen in vitro untersucht. Die Zellen wurden dazu in Serum freien Bindungspuffer inkubiert. Kupfferzellen wie Erythrozyten befinden sich in Suspension. Im Gegensatz zu in situ Studien (Muto und Fujita, 1977) und solchen Arbeiten, die mit Monolayern von Makrophagen arbeiten, konnte hier prinzipiell die gesamte Makrophagenmembran Kontakt zu den Erythrozyten aufnehmen. Zellkontakte können nicht nur von Pseudopodien,sondern auch von allen anderen Membrananteilen vermittelt werden. Der Galaktose - Partikel Rezeptor ist offenbar auf der ganzen Kupfferzelle vorhanden. Nach Markierung der Rezeptoren mit Galaktose exponierenden Glykoprotein - Gold Komplexen fanden sich diese in diskreten Clustern über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Sie sind sowohl an Pseudopodien als auch an nicht villösen Membranabschnitten zu finden (Kolb-Bachofen, 1982). Nach Sialidasebehandlung konnte keine Schädigung der Erythrozyten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einem für Kaninchen-Erythrozyten erhobenen Befund (Jancik et al., 1978).

Asialo Erythrozyten können an mehreren Stellen ihrer Oberfläche gleichzeitig gebunden werden. In seltenen Fällen kann die ganze der Kupfferzelle zugewandte Membran eines Erythrozyten gebunden sein. Unter der Voraussetzung, daß Sialinsäure ausschließlich an Galaktose gebunden ist, werden durch Sialidase etwa 2×10^6 Galaktosyl-Reste pro Ratten-Erythrozyt demaskiert (Küster und Schauer, 1981).

5.2.2 Die Bindung desialylierter Erythrozyten an Hepatozyten der Ratte

In Suspension befindliche Hepatozyten binden asialo Ratten-Erythrozyten nur mit punktartigen Kontakten an der Spitze ihrer Mikrovilli. Im Gegensatz dazu werden asialo Lymphozyten zusätzlich über breitere Membranzonen gebunden (Kolb et al., 1979). Die Annahme, daß punktförmige Bindungen nur von vergleichsweise wenigen Rezeptoren vermittelt wird, konnte durch Inhibitionsexperimente gestützt werden. Rosetten zwischen Hepatozyten und asialo Erythrozyten wurden durch 10 mal niedrigere Konzentrationen von D - Galaktose oder GalNAc verhindert als die zwischen Hepatozyten und asialo Lymphozyten (Kolb, Kolb-Bachofen und Schlepper-Schäfer, 1979). Durch Markierung mit Gold-Gal-BSA Partikeln konnte die Verteilung der Lektine demonstriert werden (Kolb-Bachofen, 1981). Lektinaktivität findet sich auf den Mikrovilli, die ursprünglich in den Disse'schen Raum ragten. Auf anderen Membranabschnitten konnte kein Lektin nachgewiesen werden.

5.2.3 Temperatureinfluß und Effekt einer Phagozytosevorbelastung der Kupfferzellen auf die Ausbildung Lektin vermittelter Zellkontakte.

Der Ausprägungsgrad Galaktose - Partikel Rezeptor vermittelter Zellkontakte hängt von der Temperatur ab. Je länger die Rosettenteste bei Raumtemperatur inkubiert werden, desto größer ist die Oberfläche der Kupfferzelle, die sich an Bindungen beteiligt. Es werden mehr Erythrozyten gebunden und es werden mehr Kontakte gebildet. Erythrozyten binden häufiger an mehreren Stellen ihrer Oberfläche gleichzeitig und an Stelle punktförmiger Kontakte treten vermehrt flächige Bindungen. Die Bindungsstellen selbst nehmen an Länge zu. Bindung durch Makrophagen Rezeptoren kann auch bei niedrigen Temperaturen ablaufen. Demgegenüber ist Phagozytose streng temperaturabhängig. So besitzt die Ingestion im Falle des C3 Rezeptors eine kritische Temperatur, unterhalb der sie nicht abläuft. Die Fc Rezeptor vermittelte Internalisation nimmt proportional zur Temperatur ab (Kaplan und Mørland, 1978). Wie erwartet konnte nach 15 minütiger Erwärmung der Rosetten auf Raumtemperatur keine Phagozytose beobachtet werden. Phagozytose ist eng mit der Funktionsfähigkeit kontraktiler Elemente des Zytoskelettes verbunden, da Membrankomponenten und evtl. auch Rezeptoren bewegt werden müssen. Die dazu notwendigen Energien können offenbar bei niedriger Umgebungstemperatur nicht vom Zellstoffwechsel bereitgestellt werden. Die Phagozytosebelastung der Kupfferzellen mit Carbon oder Latex hat keinen signifikanten Einfluß auf die Bindung und auf die Temperaturabhängigkeit der Zellkontakte.

Der bindungsintensivierende Effekt erhöhter Inkubationstemperatur ist bei Tusche markierten Kupfferzellen nur geringfügig kleiner.

Für die Ingestion opsonierter Erythrozyten wurden zwei verschiedene Mechanismen beschrieben. Mit C3 bedeckte Schafs-Erythrozyten werden von Ratten Lebermakrophagen (Munthe - Kaas et al., 1976) durch einfaches Einsinken in die Zelloberfläche aufgenommen (Krater - Mechanismus). Demgegenüber werden mit IgG opsonierte Schafs-Erythrozyten von Ratten Kupfferzellen und Maus-Peritoneal-Makrophagen durch den sogenannten Reißverschlußmechanismus phagozytiert (Munthe - Kaas et al., 1976; Kaplan, 1977). Hierzu ist eine schrittweise Interaktion von Membranrezeptoren und Liganden erforderlich, bis die ganze Oberfläche des Partikels gebunden ist (Griffin et al., 1975; Griffin et al., 1976). Morphologischer Ausdruck dieses Mechanismus sind Pseudopodien mit denen der Makrophage sein Ziel zunehmend "umfließt". Beide Mechanismen werden bei adhärenten Makrophagen beobachtet. Die Interaktion zwischen Kupfferzelle und N-RaRBC läuft aber in Suspension ab, so daß nur schwer Vergleiche zu ziehen sind. Der hohe Anteil punktförmiger Kontakte bei Bindungstesten, die 6o Minuten auf Eis inkubiert wurden und der niedrigere Anteil dieses Bindungstyps bei Erwärmung läßt vermuten, daß Punktbindungen den Initialkontakt zwischen Kupfferzelle und asialo Erythrozyt repräsentieren. Punktbindungen könnten sich bei Erwärmung der Rosetten zunehmend in Flächenkontakte umwandeln. Die Vergrößerung der Flächenkontakte bei Temperaturerhöhung wurde durch die Bestimmung der mittleren Bindungslänge belegt. Der Mechanismus, der dieser

Beobachtung zugrunde liegt, bleibt unklar. In Bindungsbereichen konnte weder eine Vermehrung des Mikrotubuli - Mikrofilament Systems nachgewiesen werden (Reaven und Axline, 1973), noch gelang eine Darstellung spezialisierter Menbranabschnitte in Bindungsbereichen, wie sie für die Fc -Rezeptor vermittelten Kontaktregionen auf Maus Peritonealmakrophagen nachgewiesen wurden (Montesano et al., 1983). In dem hier untersuchten System könnte die zunehmende Bindungsgröße auf eine schrittweise oder reißverschlußartige Kontaktaufnahme von Rezeptoren und Liganden hindeuten. Eine wesentliche Rolle könnte in diesem Zusammenhang der Brownschen Molekularbewegung zukommen, die sich wie die elastische Verformbarkeit der Membran mit der Temperatur steigert und Lektine wie Liganden in den zur Erkennung notwendigen engen räumlichen Kontakt bringt. Wie die Ausbildung pseudopodienartiger Zellkontakte zeigt, kann die Temperaturabhängigkeit der Bindung aber nicht allein aus der kinetischen Energie von Flüssigkeitsmolekülen erklärt werden.

5.2.4 Verhalten von Kupfferzellen gegenüber xenogenen Erythrozyten

Kupfferzellen besitzen die Fähigkeit, Zellkontakte zu nicht desialylierten xenogenen Erythrozyten (SRBC und HuRBC) herzustellen. Die Erythrozyten wurden weder mit Complement noch mit Antikörpern gekoppelt. Der Anteil Rosetten bildender Kupfferzellen liegt bei Inkubation mit menschlichen Erythrozyten in der Größenordnung der Bindungsteste mit asialo Ratten-Erythrozyten. Rosettenbildung mit SRBC ließ sich nur bei 6o% der Kupfferzellen nachweisen. Auch desialylierte Schafs-

und menschliche Erythrozyten werden gebunden. Desialylierung führt bei HuRBC zu keiner verstärkten Bindung. Vogt fand 1981 eine geringfügige Abnahme der Rosettenbildung bei Einsatz von desialylierten Schafs-Erythrozyten in den Bindungstest. In den eigenen Daten erhöht sich der Prozentsatz Rosetten bildender Makrophagen gegenüber Testen mit unbehandelten SRBC um 10%. Eine gesteigerte Kapazität zur Rosettenbildung nach Sialidase Behandlung von Schafs-Erythrozyten wurde auch für Peritonealmakrophagen beschrieben (Moriuchi et al., 1981). Auch die Fähigkeit menschlicher Lymphozyten SRBC zu binden, ist nach Desialylierung der SRBC vermehrt (Bentwich et al., 1973). Der elektronenmikroskopische Vergleich des Bindungsverhaltens der beiden Erythrozyten Spezies bestätigt diese Aussage. Neuraminidase-Behandlung führt im Falle der Schafs-Erythrozyten bei allen angelegten Kriterien zu einem ausgedehnteren Kontakt. Dieses Verhalten ist bei humanen Erythrozyten bei weitem nicht so ausgeprägt. Nach Brain et al.,(1971) besitzen SRBC nur annähernd die Hälfte der Oberfläche menschlicher Erythrozyten, die etwa 138 μm^2 (Canham und Burton, 1968) beträgt. Beide Erythrozytenarten werden in einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml in den Bindungstest eingesetzt. Bei humanen Erythrozyten ist infolge ihrer größeren Oberfläche bei der Zentrifugation eine erhöhte Kollisionsrate mit Kupfferzellen möglich. Dies könnte die Anzahl gebundener Erythrozyten beeinflussen. Humane wie Schafs-Erythrozyten werden aber in großem Überschuß zugegeben und Zellkontakte sind kein durch Zentrifugation hervorgerufenes Phänomen, da auch ohne Zentrifugation eine deutliche Rosettenbildung zu beobachten ist (Osburg, 1980).

Es wurde gezeigt, daß die durchschnittliche Länge der Bindungen in Testen mit HuRBC deutlich größer ist, als in solchen mit SRBC. Sie ist aber nicht doppelt so groß wie die entsprechenden Zellvolumina. Die ermittelte Bindungslänge für N-RaRBC entspricht der für SRBC, Ratten-Erythrozyten lassen sich in ihrer Größe aber zwischen HuRBC und SRBC einordnen. Die Ausdehnung der Kontaktstellen ist also weitgehend unabhängig von der Größe des Erythrozyten. Vielmehr spielen chemische und immunologische Mechanismen eine Rolle, denn Membranen von roten Blutzellen verschiedener Spezies unterscheiden sich in Komposition, Struktur und elektrophoretischer Mobilität (Nelson, 1967; Maddy, 197o). So tragen SRBC nur ein Drittel der Sialinsäuren menschlicher Erythrozyten auf ihrer Membran (Marikowski et al., 1978). Die gesteigerte Bindungsbereitschaft nach Desialylierung schließt eine direkte Beteiligung der Sialinsäuren an den Zellkontakten weitgehend aus. Durch Inhibitionsexperimente versuchte Mohr (1983) das unterschiedliche Bindungsverhalten der Erythrozyten näher zu charakterisieren. Danach werden die Zellkontakte von Kupfferzellen zu HuRBC durch den Galaktose-Partikel Rezeptor vermittelt, während bei der Bindung von SRBC noch andere Mechanismen beteiligt sind. Nach Behandlung mit Neuraminidase werden auch die Schaf-Erythrozyten ausschließlich über den Galaktose-Partikel Rezeptor gebunden. Offenbar gibt es eine weitere Komponente, die für die Zellkontakte zwischen Kupfferzellen und Schafs-Erythrozyten verantwortlich ist. Unbelastete Kupfferzellen bilden sowohl mit unbehandelten HuRBC als auch mit SRBC die ausgedehntesten Kontakte. Die desialylierten Formen werden von Tusche vorbelasteten Makrophagen über die größten Bindungsbereiche

gebunden. Die gefundenen Unterschiede sind aber nicht statistisch eindeutig zu bewerten. Auch steht das letztere Ergebnis im Gegensatz zu den Resultaten der Versuche mit Erhöhung der Inkubationstemperatur, bei denen Tusche vorbelastete Kupfferzellen eine Tendenz zu verringerter Bindung zeigen. Der Effekt einer Phagozytosevorbelastung von Kupfferzellen könnte allerdings von anderen Einflüssen, wie etwa der verwendeten Collagenase-Charge, überlagert sein.

5.2.5 Vergleich der Lektin abhängigen Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von desialylierten und TNBS gekoppelten Erythrozyten durch Kupfferzellen

5.2.5.1 Die Gewinnung alter Erythrozyten

Alte und junge Erythrozyten können mit Hilfe verschiedener Techniken getrennt werden.
Erythrozyten werden dichter, wenn sie altern (Key, 1921; Danon und Marikowsky, 1964; Ganzoni et al., 1971; Luthra et al., 1979). Aus diesem Grunde nutzen die meisten Techniken die unterschiedliche Dichte junger und alter Erythrozyten zur Trennung über Dichte-Gradienten, z.B. Rinder Serumalbumin (Piomelli et al., 1968), Phtalester Gradient (Knyszynski et al., 1978) diskontinuierlicher Ficoll-Gradient (Turner et al., 1974), Arabinogalactan-Gradient (Piomelli et al., 1978). Andere Methoden sind die Zentrifugation bei hoher Beschleunigung ohne Dichtemedium (Murphy, 1973) oder die osmotische Haemolyse, die die unterschiedliche Fragilität der Zellen ausnutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Trennung der Erythrozyten über einen Percoll-Gradienten ausgeführt. Dieses Verfahren hat sich

wiederholt als schnelle und schonende Methode erwiesen (Lutz und Fehr, 1979; Salvo et al., 1982).

5.2.5.2 TNBS - Markierung von Erythrozyten

Die Kopplung von Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) an Zellmembranen geht zurück auf Rittenberg und Pratt, 1969. Bonsall und Hunt (1971) stellten fest, daß sowohl Lipide als auch Proteine des menschlichen Erythrozyten mit TNBS reagieren. Die TNBS Markierung ist eine klassische antigene Determinante, die Antikörperproduktion und allergische Reaktionen vom verzögerten Typ auslöst. Darüber hinaus werden Erythrozyten in situ nach Kopplung mit Trinitrobenzolsulfonsäure schnell von Kupfferzellen in der Leber festgehalten. Eine Sequestrierung in der Leber hängt von der Konzentration der TNBS Reste auf der Erythrozytenmembran ab. Hohe Konzentrationen bewirken ein Festhalten in der Leber, niedrige Konzentration induzieren ein Festhalten in der Milz (Friedrich et al., 1982). TNBS ist damit auch eine determinante Gruppe für die Erkennung von "nicht selbst" auf dem Niveau von Gewebsmakrophagen (Friedrich et al., 1982).

5.2.5.3 Bindung alter Erythrozyten durch Lebermakrophagen

In Suspension befindliche Kupfferzellen können in vitro signifikant zwischen alten und jungen RaRBC unterscheiden. Werden die Kupfferzellen mit GalNAc 25mM vorinkubiert, so wird die Bindung der alten RaRBC um etwa 60% reduziert. Dies spricht für eine Beteiligung des Galaktose-Partikel bindenden Lektins bei der Erkennung alter Erythrozyten.

Es ließen sich keine morphologischen Unterschiede zwischen den Erythrozyten aus den Fraktionen alter und junger RBC nachweisen. Die Zellen wiesen keine Zeichen einer Schädigung auf. Zwar ist bekannt, daß das mittlere corpuskuläre Volumen alter Zellen abnimmt (Cohen et al., 1976), die Membranultrastruktur verändert sich aber während des Alterungsprozesses des RBC's nicht (Fischbeck et al., 1982).Es fällt auf, daß der Prozentsatz Rosetten bildender Kupfferzellen bei Einsatz "junger" Erythrozyten in den Bindungstest höher ist als bei Verwendung unbehandelter Erythrozyten. In diesem Zusammenhang muß ein Einfluß des als Separationsmedium verwandten Percolls auf die Erythrozytenmembran und die nachfolgende Interaktion mit den Kupfferzellen diskutiert werden. Percoll wurde als Medium für die Dichte-Gradienten Zentrifugation von Zellen und subcellulären Organellen eingeführt (Pertoft et al., 1978). Wakefield et al., (1982) beobachteten, daß isolierte Ratten Kupfferzellen bei 2o°C große Mengen Percoll phagozytierten. Sie stellten eine Abnahme des Anteils an Plastik adhärenter Makrophagen nach vorausgehender Percoll Exposition fest. Die Abnahme der Plastik Adhärens war auch bei 4°C zu beobachten, einer Temperatur bei der Percoll nicht aufgenommen wird. Der Effekt Percolls auf die Makrophagenadhärens kann auf eine lockere Verbindung des Dichte - Mediums mit der Zelloberfläche hinweisen, denn es gelang Wakefield et al. (1982) nicht, an die Zellmembran gebundene Percoll - Partikel nachzuweisen. In ähnlichem Sinne muß auch eine Verbindung Percolls mit der Erythrozytenmembran angenommen werden. Eine Affinität zwischen Makrophagen und Percoll

scheint im Hinblick auf die beschriebenen Resultate wahrscheinlich. Andere Autoren haben von unveränderten Monozyten/Makrophagen Aktivitäten nach Isolation über Percoll Gradienten berichtet. Dazu gehören die Phagozytose (Gmelig-Meyling & Waldmann, 1980); die Fähigkeit zur Zytotoxizität (Farram & Nelson, 1980) und die Fc Rezeptor Aktivität (Pertoft et al., 1980). Trotzdem sollten für die Isolierung alter Erythrozyten zu Bindungsstudien zukünftig andere Methoden als die Percoll Separierung verwendet werden. So wird die Beteiligung des Galaktose-Partikel Rezeptors an der in vitro Bindung alter Erythrozyten auch bestätigt, wenn die Erythrozyten nach dem von Murphy (1973) beschriebenen Verfahren gewonnen werden (Schlepper-Schäfer, 1982). Im Gegensatz zu Versuchen mit über Percoll angereicherten jungen Erythrozyten ist hierbei die Bindung junger Erythrozyten nicht höher als die Bindung von unbehandelten frisch isolierten Erythrozyten an Kupfferzellen.

Choy, Wong und Lee (1979) beobachteten bei alten Erythrozyten eine Reduzierung des Oberflächenkohlenhydratgehaltes, eine Abnahme der Sialinsäure und eine Zunahme von D-Galaktose und N-Acetylgalaktosamin in der terminalen Position der Glycoprotein - Polysaccharid Ketten.

Die durchschnittliche Länge der einzelnen Kontaktstellen nimmt von Testen mit jungen, über solche mit alten bis hin zu Testen mit desialylierten Erythrozyten zu. Dies könnte mit einer zunehmenden Galaktose Exposition auf den Membranen der Erythrozyten erklärt werden, die nach Sialidasebehandlung am ausgeprägtesten ist. Auch die Einteilung der Erythrozyten nach Zahl ihrer Bindungsstellen zeigt größere Ähnlichkeit

zwischen der Bindung alter und desialylierter Erythrozyten, als zwischen der von alten und TNBS markierten Erythrozyten.

5.2.5.4 Andere Modellvorstellungen zur selektiven Phagozytose gealterter Erythrozyten

Die selektive Phagozytose alter Erythrozyten wird jedoch auch durch andere Mechanismen erklärt. Mit zunehmendem Alter soll die Erythrozytenmembran nicht nur an Sialinsäure, sondern auch an GalNAc und Galaktose verarmen (Balduini et al., 1974); Baxter & Beeley, 1978; Gattegno et al., 1981).
Nach Neuraminidase Behandlung ist die Halbwertzeit junger Erythrozyten deutlich länger als diejenige alter desialylierter Erythrozyten (Gattegno et al., 1975).
Für menschliche Erythrozyten wird ein Auto-Antikörper-abhängiger Mechanismus der Blutsequestration diskutiert (Kay, 1975, 1979, 198o). Nachdem eine kritische Anzahl Auto-antikörper (1oo pro Zelle) an der Erythrozytenoberfläche adhärent sind, binden mononukleäre Phagozyten diese RBC mittels ihrer Fc-Rezeptoren, wobei allerdings anzumerken ist, daß die Monozyten nicht das physiologisch relevante System zur Elimi-nierung alter Erythrozyten darstellen. Die Antikörper gehören überwiegend der IgG Klasse an. Der Unterschied zwischen jungen und alten RBC soll in der Verfügbarkeit eines zellalterspezifi-schen Antigens begründet sein (Lutz, 1981). Als solches wurde ein Glycoprotein mit einem MG von 62 ooo auf gealterten Ery-throzyten identifiziert. Immunologisch soll eine Beziehung zum Bande 3 Protein bestehen (Kay et al., 1983).

Trotz der bereits beschriebenen Abnahme von Sialinsäure während des Alterungsprozesses zeigen humane junge Erythrozyten die gleiche elektrophoretische Mobilität wie gealterte (Seaman et al., 1977; Luner et al., 1977; Walter et al., 1980). Eine Erklärung hierfür wird in dem gleichzeitigen Verlust von Glycophorin und Membran gesehen (Lutz und Fehr, 1979). Für in vitro durch ATP Mangel künstlich gealterte Erythrozyten konnte gezeigt werden, daß sie Vesikel mit ähnlichem Membranproteingehalt, wie er in intakten Membranen besteht, abgeben (Lutz et al., 1977). Die Ergebnisse der Untersuchungen an menschlichen Erythrozyten sind aber nicht ohne weiteres auf das in dieser Arbeit diskutierte Modell der Alterung von Ratten-Erythrozyten zu übertragen. Werden Erythrozyten nach der Methode von Murphy (1973) getrennt, so läßt sich nämlich bei Ratten-Erythrozyten im Gegensatz zu menschlichen RBC eine abnehmende Oberflächenladung nachweisen (Walter et al., 1980). Mechanischen Faktoren, die den RBC die Milzpassage erschweren, (Cooper und Shattil, 1971; Weed, 1970), kommt für die selektive Entfernung alter Zellen aus der Zirkulation offenbar keine besondere Bedeutung zu. Nash und Wyard (1981) fanden bei alten Erythrozyten keine signifikante Änderung der Membran-Rigidität. Allerdings halten sie eine Abhängigkeit von viskösen Eigenschaften für denkbar, so wie dies von Williams und Morris (1980) angedeutet wird. Die Frage nach dem eigentlichen molekularen Erkennungszeichen für den Makrophagen wird von diesen Theorien jedoch nicht berührt (Lutz, 1981).

6. Statistischer Anhang

Tab. 12

Stichprobenumfang;
Temperatureinfluß und Einfluß der Phagozytosevorbelastung von Kupfferzellen auf die Ausbildung Lektin vermittelter Zellkontakte.

Markierung der Kupfferzellen	Anzahl ausgewerteter Kupfferzellen je Versuch		
	Inkubationsperiode bei Raumtemperatur		
	o Min	5 Min	15 Min
Keine	53	31	28
Latex	28	35	29
Tusche (1)	31	23	25
Tusche (2)	27	28	33

Tab. 13

Einfluß der Phagozytosevorbelastung und Temperatur auf die Anzahl der Bindungen pro Kupfferzelle bei Inkubation mit asialo-Ratten-Erythrozyten

Markierung der Kupfferzellen	Bindungen pro Kupfferzelle (Mittelwerte ± SA)			
	Inkubationsperiode bei Raumtemperatur			
	o Min	5 Min	15 Min	
Keine	3.6±2.4	4.2± 3.4	6.3±3.5	$p < o.ool^{+}$
Latex	2.8±1.6	2.8±2.1	7.1±3.3	$p < o.ool^{+}$
Tusche (1)	2.5±1.5	3.9±2.7	3.4±1.7	n.s.
Tusche (2)	2.6±1.4	2.5±1.8	4.1±2.1	$p < o.ol^{+}$

$^{+}$Im t-Test signif. Unterschied im Vergleich zum korrespondierenden o Min Wert
(n.s.) nicht signifikant

Tab. 14

Einteilung der Erythrozyten nach der Zahl ihrer Bindungen; Temperatureinfluß und Einfluß der Phagozytosevorbelastung von Kupfferzellen auf die Ausbildung Lektin vermittelter Zellkontakte

Markierung der Kupfferzellen	Zahl der ausgewerteten Erythrozyten pro Versuch		
	Inkubationsperiode bei Raumtemperatur		
	o Min	5 Min	15 Min
Keine	135	86	1o1
Latex	59	62	1o4
Tusche (1)	58	56	57
Tusche (2)	51	47	7o
	Anteil der Erythrozyten mit 1 Bindung (%)		
	O Min	5 Min	15 Min
Keine	71.1	61.6	45.6
Latex	74.6	59.7	38.5
Tusche (1)	74.1	51.8	59.7
Tusche (2)	68.6	59.6	45.7
	Anteil der Erythrozyten mit 2 Bindungen (%)		
	o Min	5 Min	15 Min
Keine	18.5	26.7	39.6
Latex	2o.3	25.8	34.6
Tusche (1)	2o.7	37.5	31.6
Tusche (2)	25.5	31.9	25.7
	Anteil der Erythrozyten mit 3 Bindungen (%)		
	o Min	5 Min	15 Min
Keine	9.6	1o.5	11.9
Latex	3.4	11.3	19.2
Tusche (1)	5.2	1o.7	5.3
Tusche (2)	5.9	8.5	18.6

Fortsetzung der Tab. 14

Markierung der Kupfferzellen	Anteil der Erythrozyten mit 4 Bindungen (%)		
	o Min	5 Min	15 Min
Keine	o.7	1.2	2.o
Latex	1.7	3.2	4.8
Tusche (1)	-	-	3.5
Tusche (2)	-	-	lo.o
	Anteil der Erythrozyten mit 5 Bindungen (%)		
	o Min	5 Min	15 Min
Keine	-	-	1.o
Latex	-	-	2.9

Tab. 15

Stichprobenumfang; Zellkontakte zwischen Kupfferzellen und xenogenen Erythrozyten

Erythrozyten	Anzahl ausgewerteter Kupfferzellen je Versuch		
	Markierung der Kupfferzellen mit		
	Keine	Latex	Tusche
HuRBC	32	42	17
N-HuRBC	39	29	27
SRBC	27	32	22
N-SRBC	33	13	26
N-RaRBC	41	35	24

Tab. 16

Einfluß der Phagozytosevorbelastung und der Erythrozytenart auf die Anzahl gebundener Erythrozyten pro Kupfferzelle

Erythrozyten	Gebundene Erythrozyten pro Kupfferzelle (± SA)			
	Markierung der Kupfferzellen			
	Keine		Latex	Tusche
HuRBC	3.0±1.4	$p<0.01^+$	2.2±1.2	3.3±1.7 $p<0.01^+$
N-HuRBC	3.0±1.5		2.3±1.3	3.4±1.8
SRBC	2.0±1.1		1.6±0.8	1.9±0.8
N-SRBC	2.5±1.6		2.1±1.5	2.9±1.5 $p<0.01^+$
N-RaRBC	2.4±1.2		2.1±1.3	2.6±1.5

$^+$Im t-Test signif. Unterschied im Vergleich zu den korrespondierenden Werten für SRBC

Tab. 17

Einteilung der Erythrozyten nach der Zahl ihrer Bindungen; Zellkontakte zwischen Kupfferzellen und xenogenen Erythrozyten

Erythrozyten	Zahl der ausgewerteten Erythrozyten pro Versuch		
	Markierung der Kupfferzellen		
	Keine	Latex	Tusche
HuRBC	96	94	56
N-HuRBC	115	66	92
SRBC	54	52	41
N-SRBC	82	27	75
N-RaRBC	98	74	63

Fortsetzung der Tab. 17

Erythrozyten	Markierung der Kupfferzellen		
	Keine	Latex	Tusche
	Anteil der Erythrozyten mit 1 Bindung (%)		
HuRBC	62.5	48.9	53.6
N-HuRBC	47.o	42.4	56.5
SRBC	68.5	59.6	73.1
N-SRBC	66.9	44.4	61.3
N-RaRBC	7o.4	59.5	52.4
	Anteil der Erythrozyten mit 2 Bindungen (%)		
HuRBC	26.0	3o.9	28.6
N-HuRBC	34.8	33.3	21.7
SRBC	27.8	28.9	19.5
N-SRBC	25.6	29.6	25.3
N-RaRBC	16.3	31.1	28.6
	Anteil der Erythrozyten mit 3 Bindungen (%)		
HuRBC	8.3	19.2	8.9
N-HuRBC	9.6	15.2	13.o
SRBC	3.7	5.8	7.3
N-SRBC	6.1	25.9	12.o
N-RaRBC	12.3	9.5	14.3
	Anteil der Erythrozyten mit 4Bindungen (%)		
HuRBC	1.o	1.1	7.4
N-HuRBC	7.8	9.1	5.4
SRBC	-	3.9	-
N-SRBC	1.2	-	1.3
N-RaRBC	1.o	-	3.2

Erythrozyten mit 5 Bindungsstellen fanden sich nur vereinzelt

Tab. 18

Stichprobenumfang; Vergleich der Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von asialo und TNBS markierten Erythrozyten durch Kupfferzellen in vitro

Erythrozyten	Anzahl ausgewerteter Kupfferzellen pro Versuch
Alte RaRBC	36
Junge RaRBC	29
N-RaRBC	24
TNBS-RaRBC	29

Tab. 19

Anzahl gebundener Erythrozyten und Bindungen pro Kupfferzelle; Vergleich der Bindung alter Ratten-Erythrozyten mit der Erkennung von asialo und TNBS markierten Erythrozyten durch Kupfferzellen in vitro

Erythrozyten	Anzahl geb.Erythrozyten	Anzahl der Bindungen
Alte RaRBC	1.7 $\pm$ o.9	2.2 $\pm$ 1.2
Junge RaRBC	1.4 $\pm$ o.6	1.7 $\pm$ 1.o
N-RaRBC	2.6 $\pm$ 1.5	4.5 $\pm$ 3.6
TNBS-RaRBC	2.1 $\pm$ 1.5	3.6 $\pm$ 1.8

7. Literaturverzeichnis

Ackerman, S.K. und Douglas, S.D. (1980)
MONOCYTES
in: The Reticuloendothelial System, Volume 1 Morphology
Hrsg.: Carr, J. und Daems, W.T.
Plenum Press New York und London

Ashwell, G. und Morell, A.G. (1974)
THE ROLE OF SURFACE CARBOHYDRATES IN THE RECOGNITION AND TRANSPORT OF CIRCULATING GLYCOPROTEINS
Advanc Enzymol., 41 , 99

Ashwell, G. und Morell, A.G. (1977)
MEMBRANE GLYCOPROTEINS AND RECOGNITION PHENOMENA
Trend Biochem. Sci., 41 , 76

Balduini, C., Balduini, C.L. und Ascari, E. (1974)
MEMBRANE GLYCOPEPTIDES FROM OLD AND YOUNG HUMAN ERYTHROCYTES
Biochem. J., 140, 557

Baxter, A. und Beeley, J.G. (1975)
CHANGES IN SURFACE CARBOHYDRATE OF HUMAN ERYTHROCYTES AGED IN VIVO
Biochem. Soc. Transactions, 3 , 134

Baxter, A. und Beeley, J.G. (1978)
SURFACE CARBOHYDRATES OF AGED ERYTHROCYTES
Biochem. Biophys. Res. Commun., 83 , 466

Bentwich, Z., Douglas, S.D., Siegal, R.P. und Kunke H.G.(1973)
HUMAN LYMPHOCYTE - SHEEP ERYTHROCYTE ROSETTE FORMATION: SOME CHARACTERISTICS OF THE INTERACTION
Clin. immunopath. 1 , 511

Berry, M.N. und Friend, D.S. (1969)
HIGH - YIELD PREPARATION OF ISOLATED RAT LIVER PARENCHYMAL CELLS
J. Cell Biol., 43 , 506

Blumenstock, FA., Saba, T.M., Weber, P. und Laffin, R. (1978)
BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HUMAN OPSONIC $_2$SB GLYCOPROTEIN. ITS IDENTITY WITH COLD-INSOLUBLE GLOBULIN
J. Biol. Chem. 253, 4287

Blumenstock, F.A., Saba, T.M. Cardarelle, P.M. und Cho, E. (1983)
AMPLIFICATION OF THE OPSONIC ACTIVITY OF FIBRONECTIN BY A PLASMA FACTOR LACKING GELATIN AFFINITY
Res: Journal of the Reticuloendothelial Society 33 , 21

Bonsall, R.W. und Hunt, S. (1971)
REACTIVITY OF THE HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE TO SODIUM TRINITROBENZENESULPHONATE
Biochim. Biophys. Acta, 249 , 281

Brain, P., Gordon,J. und Willetts, W.A. (197o)
ROSETTE FORMATION BY PERIPHERAL LYMPHOCYTES
Clin. exp. Immunol. 6 , 681

Branster, M.V. und Morton, R.K. (1957)
ISOLATION OF INTACT LIVER CELLS
Nature 18o , 1283

Brouver, A., Wanson, J.C., Mosselmans, R., Knook, D.L. und Drochmans, P. (198o)
MORPHOLOGY AND LYSOSOMAL ENZYME ACTIVITY OF PRIMARY CULTURES OF RAT LIVER SINUSOIDAL CELLS
Biol. Cellulaire, 37 , 35

Canham, P.B. und Burton, A.C. (1968)
DISTRIBUTION OF SIZE AND SHAPE IN POPULATIONS OF NORMAL HUMAN RED CELLS
Circulation Research, 22 , 4o5

Choy, Y.M., Wong, S.L. und Lee, C.Y. (1979)
CHANGES IN SURFACE CARBOHYDRATES OF ERYTHROCYTES DURING IN VIVO AGING
Biochem. Biophys.Res. Commun.,91 , 41o

Cohen, N.S., Ekholm, J.E., Luthra, G., Hanahan, D.J. (1976)
BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF DENSITY SEPARATED HUMAN ERYTHROCYTES
Biochim. Biophys. Acta, 419 , 229

Cooper, R.A. und Shattil, S.J. (1971)
MECHANISMS OF HEMOLYSIS - THE MINIMAL RED - CELL DEFECT
New Engl. J. Med. 285 , 1514

Cotran, R.S., Suter, E.R. und Majno, G. (1967)
THE USE OF COLLOIDAL CARBON AS A TRACER FOR VASCULAR INJURY
Vasc. Dis. 4 , 1o7

Crofton, R.W., Diesselhoff - den Dulk, M.M. und van Furth, R. (1978)
THE ORIGIN, KINETICS, AND CHARACTERISTICS OF THE KUPFFER CELLS IN THE NORMAL STEADY STATE
J.Exp.Med., 148 , 1

Czop, J.K., Fearon, D.T. und Austen, K.F. (1978)
MEMBRANE SIALIC ACID ON TARGET PARTICLES MODULATES THEIR PHAGOCYTOSIS BY A TRYPSIN - SENSITIVE MECHANISM ON HUMAN MONOCYTES
Proc. Natl. Acad. Sic. USA 75, Cell Biology, 3831

Danon, D. und Marikowsky, Y. (1964)
DETERMINATION OF DENSITY DISTRIBUTION OF RED CELL POPULATION
J.Lab. Clin. Med. 64 , 668

Deimann, W. und Fahimi, H.D. (1979)
THE APPEARANCE OF TRANSITION FORMS BETWEEN MONOCYTES AND KUPFFER CELLS IN THE LIVER OF RATS TREATED WITH GLUCAN
J. Exp.Med., 149 , 883

Diesselhof - den Dulk, M.M., Crofton, R.W. und van Furth, R. (1979)
ORIGIN AND KINETICS OF KUPFFER CELLS DURING AN ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE
Immunology, 37 , 7

Doolittle, R.L. und Richter, G.W. (1981)
ISOLATION AND CULTURE OF KUPFFER CELLS AND HEPATOCYTES FROM SINGLE RAT LIVERS WITH OBSERVATIONS ON IRON - LOADED KUPFFER CELLS
Laboratory Investigation 45 , No 6, 558

Drochmans, P., Sleyster, E.Ch., Penasse, W., Wanson, J.C. und Knook, D.L. (1977)
MORPHOLOGY OF ISOLATED AND CULTURED SINUS - LINING CELLS OF RAT LIVER, in: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells
Hrsg.: Wisse, E. und Knook, D.L.
Elsevier/North Holland

Dulbecco, R. und Vogt, M. (1954)
PLAQUE FORMATION AND ISOLATION OF PURE LINES WITH POLIOMYELITIS VIRUSES
J.Exp.Med. 99 , 167

Farram, E. und Nelson, D.S. (1980)
MECHANISM OF ACTION OF MOUSE MACROPHAGES AS ANTI - TUMOR EFFECTOR CELL = ROLE OF ARGINASE
Cell. Immunol. 55 , 283

Fishbeck, K.H., Bonilla, E. und Schotland, D.J. (1982)
FREEZE - FRACTURE CHARATERIZATION OF "YOUNG"AND "OLD" HUMAN ERYTHROCYTES
Biochim.Biophys. Acta, 685, 207

Freimer, N.B., Ögmundsdottir, H.M., Blackwell C.C., Sutherland, I.W., Grahame, L. und Weir, D.M. (1978)
THE ROLE OF CELL WALL CARBOHYDRATES IN BINDING OF MICROORGANISMS TO MOUSE PERITONEAL EXSUDATE MACROPHAGES
Acta. Path. Microbiol.Scand. Sect B. 86 , 53

Friedman, R.L. und Moon, R.J. (1977)
HEPATIC CLEARANCE OF SALMONELLA TYPHIMURIUM IN SILICATREATED MICE
Infect. Immun. 16 , 1005

Friedrich, E.A., Aulenbacher, P., Schlepper-Schäfer, J. und Süss, R. (1982)
KUPFFER CELLS RECOGNIZE TRINITROBENZENE - LABELED ERYTHROCYTES
Immunology Letters, 4 , 167

Furthmayr, H. (1978)
STRUCTURAL COMPARISON OF GLYCOPHORINS AND IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF GENETIC VARIANTS
Nature ,271 , 519

Gahmberg, C.G. und Hakomori, S.-J. (1973)
EXTERNAL LABELING OF CELL SURFACE GALACTOSE AND GALACTOSAMINE IN GLYCOLIPID AND GLYCOPROTEIN IN HUMAN ERYTHROCYTES
J. Biol. Chem. 248 , 4311

Gahmberg, C.G., Myllyla, G., Leikola, J. Pirkola, A. und Nordling, S. (1976)
ABSENCE OF THE MAJOR SIALOGLYCOPROTEIN IN THE MEMBRANE OF HUMAN EN (a-) ERYTHROCYTES AND INCREASED GLYCOSYLATION OF BAND 3
J.Biol. Chem. 251 , 6108

Ganzoni, A.M., Oakes R., Hillman R.S. (1971)
RED CELL AGING IN VITRO
J. Clin. Invest.50 , 1373

Gartner, D.A. und Kay, E.R.M. (1967)
THE PREPARATION OF METABOLICALLY ACTIVE SUSPENSIONS OF MOUSE LIVER CELLS
Experientia 23 , 596

Gattegno, L., Bladier, D. und Cornillot, P. (1975)
AGING IN VIVO AND NEURAMINIDASE TREATMENT OF RABBIT ERYTHROCYTES : INFLUENCE OF HALF - LIFE AS ASSESSED BY 51 Cr LABELLING
Hoppe - Seylers Z. Physiol. Chem., 356 , 391

Gattegno, L., Perret, G., Fabia, F., Bladier D. und Cornillot, P. (1981)
IN VIVO AGEING OF HUMAN ERYTHROCYTES AND CELL-SURFACE LABELING BY D-GALACTOSE OXIDASE AND SODIUM BORTRITIDE
Carbohydrate Research 95 , 283

Gendrault, J.L., Steffan, A.M., Bingen, A. und Kirn,A. (1977)
INTERACTION OF FROG VIRUS 3 (F V 3) WITH SINUSOIDAL CELLS, in: Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells
Hrsg.: Wisse E. und Knook, D.L.
Elsevier/North Holland

Glass, E., Stewart, J. und Weir, D.M. (1981)
PRESENCE OF BACTERIAL BINDUNG 'LECTIN-LIKE' RECEPTORS ON PHAGOCYTES
Immunology 44,529

Gmelig - Meyling, F. und Waldmann, T.A. (1980)
SEPARATION OF HUMAN BLOOD MONOCYTES AND LYMPHOCYTES ON A CONTINUOUS PERCOLL GRADIENT
J. Immunol. Methods 33 , 1

Griffin, F.M., Griffin, J.A., Leider, J.E. und Silverstein S.C. (1975)
STUDIES ON THE MECHANISM OF PHAGOCYTOSIS
I. Requirements for Circumferential Attachment of Particle-Bound Ligands to Specific Receptors on the Macrophage Plasma Membrane
The Journal of Experimental Medicine, 142 , 1263

Griffin, F.M., Griffin, J.A., Silverstein, S.C. (1976)
STUDIES ON THE MECHANISM OF PHAGOCYTOSIS
II. The interaction of macrophages with anti-immuno globulin Jg G - coates bone morrow - derived lymphocytes
J. Exp. Med. 144 , 788

Hennig, A. (1957)
DAS PROBLEM DER KERNMESSUNG. EINE ZUSAMMENFASSUNG UND ERWEITERUNG DER MIKROSKOPISCHEN TECHNIK
Mikroskopie 12 , 174

Hennig, A. (1958)
KRITISCHE BETRACHTUNGEN ZUR VOLUMEN- UND OBERFLÄCHENMESSUNG IN DER MIKROSKOPIE
Zeiß - Werk - Z. 6 (3o), 78

Howard, R.B., Christensen, A.K., Gibbs, F.A. und Pesch, L.A. (1967)
THE ENZYMATIC PREPARATION OF ISOLATED INTACT PARENCHYMAL CELLS FROM RAT LIVER
J. Cell Biol. 35 , 675

Howard R.B. und Pesch, L.A. (1968)
RESPIRATORY ACTIVITY OF INTACT, ISOLATED PARENCHYMAL CELLS FROM RAT LIVER
J. Biol. Chem. 243 , 31o5

Hubbard, A.L. und Cohn, Z.A. (1972)
THE ENZYMATIC IODINATION OF THE RED CELL MEMBRANE
J. Cell Biol. 55 , 39o

Hubbard, A. und Stukenbrok, H. (1979)
AN ELECTRON MICROSCOPE AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF THE CARBOHYDRATE RECOGNITION SYSTEM IN THE RAT LIVER II.
J. Cell. Biol. 83 , 65

Hubbard, A., Wilson, Gl. Ashwell, G. und Stukenbrok, H. (1979)
AN ELECTRON MICROSCOPE AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF THE RAT LIVER I
J. Cell. Biol.83 , 47

Ito, T., (1973)
RECENT ADVANCES IN THE STUDY OF THE FINE STRUCTURE OF THE HEPATIC SINUSOIDAL WALL : A REVIEW
Gunma Rep. Med. Sci. 6 , 119

Jancik, J.M., Schauer, R., Andres, K.H. und von Düring M. (1978)
SEQUESTRATION OF NEURAMINIDASE TREATED ERYTHROCYTES-
STUDIES ON ITS TOPOGRAPHIC, MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC ASPECTS
Cell Tiss. Res., 186 , 2o9

Kaplan, G. (1977)
DIFFERENCES IN THE MODE OF PHAGOCYTOSIS WITH FC AND C_3 RECEPTORS IN MACROPHAGES
Scand. J. Immunol. 6 , 797

Kaplan, G. und Mørland, B. (1978)
PROPERTIES OF A MURINE MONOCYTIC TUMOR CELL LINE J-774 IN VITRO
I. MORPHOLOGY AND ENDOCYTOSIS
Exp. Cell Res. 115 , 53

Kay, M.M.B. (1975)
MECHANISM OF REMOVAL OF SENESCENT CELLS BY HUMAN MACROPHAGES IN SITU
Proc.Nat.Acad. Sci. USA, 72 , 3521

Kay, M.M.B. (1979)
ROLE OF PHYSIOLOGIC AUTOANTIBODY IN THE REMOVAL OF SENESCENT HUMAN RED CELLS
J. Supramol.Struct., 9 , 555

Kay, M.M.B. (198o)
in: AGING PHENOMENA: RELATIONSHIP AMONG DIFFERENT LEVELS OF ORGANIZATION
Hrsg.: Oota, K., Makinodan, T., Iriki, M., Baker, L.S.
Plenum Press, New York

Kay, M.M.B., Goodman, S.R., Sorensen, K., Whitfied, C.F., Wong, P., Zaki, L. und Rudloff, V. (1983)
SENESCENT CELL ANTIGEN IS IMMUNOLOGICALLY RELATED TO BAND 3
Proc. Nat.Acad.Sci. USA, Cell Biology, 8o , 1631

Kelley, L.S. und Dobson, E.L. (1971)
EVIDENCE CONCERNING THE ORIGIN OF LIVER MACROPHAGES
B.J. Exp. Path., 52 , 88

Key, J.A. (1921)
STUDIES ON ERYTHROCYTES, WITH SPECIAL REFERENCE TO RETICULUM, POLYCHROMATOPHILIA AND MITOCHONDRIA
Arch. Intern.Med. 28 , 511

Knyszynski, A., Leibovich, S.J., Skutelsky, E. und Danon, D. (1978)
MACROPHAGES FROM UNSTIMULATED, MINERAL OIL AND THIOGLYCOLLATE STIMULATED MICE:
A COMPARATIVE STUDY OF SURFACE ANIONIC SITES AND PHAGOCYTOSIS OF "OLD" RED BLOOD CELLS
Journal of the Reticuloendothelial Societa, 24 , 2o5

Kolb, H.A. und Adam, G. (1976)
REGULATION OF ION PERMEABILITIES OF ISOLATED RAT LIVER CELLS BY EXTERNAL CALCIUM CONCENTRATION AND TEMPERATURE
J. Membrane Biol., 26 , 121

Kolb, H., Kriese, A., Kolb-Bachofen, U. und Kolb, H.A. (1978)
POSSIBLE MECHANISM OF ENTRAPMENT OF NEURAMINIDASE TREATED LYMPHOCYTES IN LIVER
Cell. Immunol., 4o , 457

Kolb, H., Schudt, C., Kolb-Bachofen, V. und Kolb, H.A. (1978)
CELLULAR RECOGNITION BY RAT LIVER CELLS OF NEURAMINIDASE TREATED ERYTHROCYTES
Exp.Cell Res., 113 , 319

Kolb, H. und Kolb-Bachofen, V. (1978)
A LECTIN LIKE RECEPTOR ON MAMMALIAN MACROPHAGES
Biochem. Biophys. Res. Commun., 85 , 678

Kolb, H., Kolb-Bachofen, V. und Schlepper-Schäfer, J. (1979)
CELL CONTACTS MEDIATED BY D-GALACTOSE SPECIFIC LECTINS ON LIVER CELLS
Biol. Cell., 36 , 3o1

Kolb, H., Friedrich, E., Süss, R. (1981)
LECTIN MEDIATES HOMING OF SIALIDASE - TREATED ERYTHROCYTES OF THE LIVER AS REVEALED BY SCINTIGRAPHY
Hoppe-Seyler´s Z. Physiol.Chem. 362 , 16o9

Kolb-Bachofen, V. (1981)
HEPATIC RECEPTOR FOR ASIALO - GLYCOPROTEINS
ULTRASTRUCTURAL DEMONSTRATION OF LIGAND - INDUCED MICRO-AGGREGATION OF RECEPTORS
Biochim. Biophys. Acta, 645 , 293

Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schäfer, J., Vogell, W. und Kolb, H. (1982)
ELECTRON MICROSCOPIC EVIDENCE FOR AN ASIALO GLYCOPROTEIN RECEPTOR ON KUPFFER CELLS: LOCALIZATION OF LECTIN - MEDIATED ENDOCYTOSIS
Cell 29, 859

Küster, J.M. und Schauer, R. (1981)
PHAGOCYTOSIS OF SIALIDASE - TREATED RAT ERYTHROCYTES: EVIDENCE FOR A TWO - STEP MECHANISM
Hoppe - Seyler´s Z. Physiol.Chem. 362 , 15o7

Laws, J.O. und Strickland, L.H. (1961)
THE ADHESION OF LIVER CELLS
Exp.Cell. Res. 24 , 24o

Lichr, H. und Grün, M. (1977)
CLINICAL ASPECTS OF KUPFFER CELL FAILURE IN LIVER DISEASES
in: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, 427
Hrsg.: Wisse, E. und Knook, D.L.
Elsevier, Amsterdam

Lipson L.Q., Margolis, S. und Capuzzi, D.M. (1969)
COMPARISON OF ACETATE AND AMINO ACID INCORPORATION IN RAT LIVER CELLS ISOLATED BY THREE TECHNIQUES
Fed. Proc. 28, 366

Lis, H. und Sharon, N. (1973)
THE BIOCHEMISTRY OF PLANT LECTINS (PHYTOHEMAGGLUTININ)
Ann. Rev. Biochem., 42 , 514

Longmuir, I.S. und Rees W. (1956)
PREPARATION OF CELL SUSPENSIONS FROM RAT LIVERS
Nature 177 , 997

Luner, S.J., Szklarek, D., Knox R.J., Seamon, G.V.F., Josefowicz, J.Y., Ware, B.R. (1977)
RED CELL CHARGE IS NOT A FUNCTION OF CELL AGE
Nature (Lond.) 269 , 719

Luthra, M.G., Friedman, J.M. und Sears, D.A. (1979)
STUDIES OF DENSITY FRACTIONS OF NORMAL HUMAN ERYTHROCYTES LABELED WITH IRON - 59 IN VIVO
J.Lab. Clin.Med. 94 , 879

Lutz, H.U., Lomant, A.J., McMillan, P. und Wehrli, E. (1977)
REARRANGEMENTS OF INTEGRAL MEMBRANE COMPONENTS DURING IN VITRO AGING OF SHEEP ERYTHROCYTE MEMBRANES
J.Cell Biol., 74 , 389

Lutz, H.U. und Fehr, J. (1979)
TOTAL SIALIC ACID CONTENT OF GLYCOPHORINS DURING SENESCENCE OF HUMAN RED BLOOD CELLS
J. Biol.Chem., 254 , 11177

Lutz, H.U. (1981)
ELIMINATION ALTER ERYTHROZYTEN AUS DER ZIRKULATION: FREILEGUNG EINES ZELLALTER-SPEZIFISCHEN ANTIGENS AUF ALTERNDEN ERYTHROZYTEN
Schweiz med. WSchr. 111 , 1507

Maddy, A.H. (1970)
ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEINS
Sem.hemat. 7 , 275

Marikowsky Y. und Danon, D. (1969)
ELECTRON MICROSCOPE ANALYSIS OF YOUNG AND OLD RED BLOOD CELLS STAINED WITH COLLODIAL IRON FOR SURFACE CHARGE EVALUATION
J. Cell Biol., 43 , 1

Marikowsky Y., Khodadad, J.K., Weinstein, R.S. (1978)
INFLUENCE OF RED CELL SHAPE ON SURFACE CHARGE TOPOGRAPHY
Exp. Cell Res. 116 , 191

Marikowsky,Y. und Weinstein (1981)
LATERAL MOBILITY OF NEGATIVE CHARGE SITES AT THE SURFACE OF SHEEP ERYTHROCYTES
Exp. Cell Res. 136 , 169

Mohr, (1983)
Dissertation der med.Fak. der Uni Düsseldorf

Montesano, R., Mossaz, D., Vassalli, P. und Orci,L. (1983)
SPEZIALIZATION OF THE MACROPHAGE PLASMA MEMBRANE AT SITES OF INTERACTION WITH OPSONIZED ERYTHROCYTES
J.Cell Biol., 96 , 1227

Moriuchi, T., Moriuchi, J. und Kobayaschi, H. (1981)
A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF RAT MACROPHAGES USING NEURAMINIDASE - TREATED SHEEP OR GUINEA PIG ERYTHROCYTES
Immunology Letters, 3 , 257

Morley, C.Q.D. und Kingdon, H.S. (1972)
USE OF ^{3}H - THYMIDINE FOR MEASUREMENT OF DNA SYNTHESIS IN RAT LIVER : A WARNING
Anal. Biochem. 45 , 298

Munthe - Kaas, A.C., Berg, T. und Seljelid, R. (1975)
MASS ISOLATION AND CULTURE OF RAT KUPFFER CELLS
J. Exp.Med. 141 , 1

Munthe - Kaas, A.C., (1976)
PHAGOCYTOSIS IN RAT KUPFFER CELLS IN VITRO
Exp. Cell Res. 99 , 319

Munthe - Kaas, A.C., Kaplan, G. und Seljelid, R. (1976)
ON THE MECHANISM OF INTERNALISATION OF OPSONIZED PARTICLES BY RAT KUPFFER CELLS IN VITRO
Exp. Cell Res. 1o3 , 2o1

Murphy, J. (1973)
INFLUENCE OF TEMPERATURE AND METHOD OF CENTRIFUGATION ON THE SEPARATION OF ERYTHROCYTES
J. Lab.Clin. Med. 82 , 334

Muto, M. und Fujita, T. (1977)
PHAGOCYTIC ACTIVITIES OF THE KUPFFER CELL : A SCANNING ELECTRON MICROSCOPE STUDY
in: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells
Hrsg.: Wisse, E. und Knook, D.L.
Elsevier/North Holland

Nagamura Y. und Kolb, H. (198o)
PRESENCE OF A LECTIN-LIKE RECEPTOR FOR D-GALACTOSE ON RAT PERITONEAL MACROPHAGES
FEBS Lett. 115 , 59

Nash, G.B. und Wyard, S.J. (1981)
ERYTHROCYTE MEMBRANE ELASTICITY DURING IN VIVO AGEING
Biochim. Biophys.Acta, 643 , 269

Nelson, G.J. (1967)
LIPID COMPOSITION OF ERYTHROCYTES IN VARIOUS MAMMALIAN SPECIES
Biochim. Biophys.Acta 144 , 221

Neufeld, F. und Ashwell, G. (198o)
CARBOHYDRATE RECOGNITION SYSTEMS FOR RECEPTOR MEDIATED PINOCYTOSIS,
in: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans
Hrsg.: Lennarz, W.J., S. 241
Plenum Press, New York

Osburg, (198o)
CHARAKTERISIERUNG EINES D-GALAKTOSE SPEZIFISCHEN REZEPTORS AUF KUPFFERZELLEN DER RATTE
Diplomarbeit der math.nat. Fakultät der Univers.Düsseldorf

Ögmundsdottir, H.M., Weir, D.M und Marmion, B.P. (1978)
BINDING OF MICRO-ORGANISMS TO THE MACROPHAGE PLASMA MEMBRANE; EFFECTS OF ENZYMES AND PERIODATE
Brit.J. exp.Path. 59 , 1

Pertoft, H., Laurent, T.C., Laas, T. und Kogedal, L. (1978)
DENSITY GRADIENTS PREPARED FROM COLLOIDAL SILICIA PARTICLES COATED BY POLYVINILPYRROLIDONE (PERCOLL)
Anal.Biochem. 88 , 271

Pertoft, H., Johnsson, A., Wärmegard, B. und Seljelid, R. (198o)
SEPARATION OF HUMAN MONOCYTES ON DENSITY GRADIENTS OF PERCOLL
J. Immunol. Methods 33 , 221

Piomelli, S., Corash, L.M., Davenport, D.D., Miraglia, J., Amorosi, E.L. (1968)
IN VIVO LABILITY OF GLUCOSE - 6 - PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN GdA AND GD - MEDITERRANEAN DEFICIENCY
J. Clin. Invest. 47 , 94o

Piomelli, S., Seaman, C., Reibman, J., Tytum, A., Graziano, J., Tabachnik, N. und Corash, L.M. (1978)
SEPARATION OF YOUNGER RED CELLS WITH IMPROVED SURVIVAL IN VIVO: AN APPROACH TO CHRONIC TRANSFUSION THERAPY
Proc.Natl.Acad. Sci. USA 75 , 3474

Platt, D. und Norwig, P. (198o)
BIOCHEMICAL STUDIES OF MEMBRANE GLYCOPROTEINS DURING RED CELL AGING
Mechanisms of Ageing and Development, 14 , 119

Polliack, A. und Gordon, S. (1975)
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF MURINE MACROPHAGES SURFACE CHARACTERISTICS DURING MATURATION, ACTIVATION, AND PHAGOCYTOSIS
Laboratory Investigation 33 , 469

Praaning - van Dalen, D.P., Brouver, A. und Knook, D.L. (1981)
CLEARANCE CAPACITY OF RAT LIVER KUPFFER, ENDOTHELIAL, AND PARENCHYMAL CELLS
Gastroenterology 81 , 1o36

Preusser, H.-J. (1981)
BIOLOGISCHE OBJEKTE IM TRANSMISSIONS - ELEKTRONENMIKROSKOP TEIL 1):
DIE HERSTELLUNG VON ULTRADÜNNSCHNITTEN
Kontakte (Merk), 2 , 3

Raeven, E.P. und Axline, S.G. (1973)
SUBPLASMALEMMAL MICROFILAMENTS AND MICROTUBULES IN RESTING AND PHAGOCYTIZING CULTIVATED MACROPHAGES
J. Cell Biol. 59 , 12

Rittenberg, M.B. und Pratt, K.L. (1969)
ANTITRINITROPHENYL (TNP) PLAQUE ASSAY.
PRIMARY RESPONSE OF BALB/C MICE TO SOLUBLE AND PARTICULATE IMMUNOGEN
Proc. Soc. Exp.Biol. Med. 132 , 575

Roos, E. und Dingemans, K.P. (1977)
PHAGOCYTOSIS OF TUMOR CELLS BY KUPFFER CELLS IN VIVO AND IN THE PERFUSED MOUSE LIVER,
in: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal cells
Hrsg.: Wisse, E. und Knook, D.L.
Elsevier/North Holland

Saba, T.M. (1975)
ASPECIFIC OPSONINS
in: The Immune System and Infectious Disease
Hrsg.: Neter, E. und Milgrom F.
Basel: S. Karger

Sabesin, S.M. und Koff, R.S. (1974)
PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL VIRAL HEPATITIS
N. Engl. J. Med. 25 , 944

Salvo, G., Caprari, P., Samoggia, P., Mariani, G. und Salvati, A.M. (1982)
HUMAN ERYTHROCYTE SEPARATION ACCORDING TO AGE ON A DISCONTINUOUS'PERCOLL' DENSITY GRADIENT
Clinica chimica Acta, 122 , 293

Seaman, G.V.F., Knox, R.J., Nordt, F.J. und Regan, D.H. (1977)
RED CELL AGING.
I. SURFACE CHARGE DENSITY AND SIALIC ACID CONTENT OF DENSITY FRACTIONATED HUMAN ERYTHROCYTES
Blood 5o , 1ool

Seglen, P.O. (1972)
PREPARATION OF RAT LIVER CELLS
I. EFFECT OF CALCIUM ENZYMATIC DISPERSION OF ISOLATED, PERFUSED LIVER
Exp. Cell Res. 74 , 45o

Seglen, P.O. (1976)
PREPARATION OF ISOLATED RAT LIVER CELLS
in: Methods of Cell Biology, Vol 13, 29
Hrsg.: Prescott, D.M.
New York, Acadimic Press

Schlepper-Schäfer, J., Kolb-Bachofen, V. und Kolb, H. (198o)
ANALYSIS OF LECTIN - DEPENDENT RECOGNITION OF DESIALYLATED ERYTHROCYTES BY KUPFFER CELLS
Biochem. J. 186 , 827

Schlepper-Schäfer, J., Kolb-Bachofen, V., Friedrich, E. und Kolb, H. (198o)
GALACTOSE - SPECIFIC LECTINS ON LIVER CELLS : ELECTRON MICROSCOPIC LOCALISATION AND POSSIBLE FUNCTION IN CELL RECOGNITION
in: Glycoconjugates, S. 386
Hrsg.: Yamakawa, T., Osawa, T. und Handa, S.
Japan Scientific Societies Press, Tokio

Schlepper-Schäfer, J., Kolb-Bachofen, V., Holl, N., Friedrich,E. undKolb, H. (1982)
GALACTOSE - SPECIFIC LECTIN ON RAT KUPFFER CELLS : LOCALIZATION AND FUNCTION
in: Sinusoidal Liver Cells
Hrsg.: Knook, D.L. und Wisse, E.
Elsevier Biomedical Press

Schlesinger, P.H., Doebber, T.W., Mandell, B.F., White, R., Deschryver, D., Rodman, J.S., Moller, M.J. und Stahl,P. (1978)
PLASMA CLEARANCE OF GLYCOPROTEINS WITH TERMINAL MANNOSE AND N-ACETYL GLUCOSAMINE BY LIVER NON PARENCHYMAL CELLS
Biochem. J. 176 , 1o3

Schreiber, G. und Schreiber, M. (1973)
THE PREPARATION OF SINGLE CELL SUSPENSIONS FROM LIVER AND THEIR USE FOR THE STUDY OF PROTEIN SYNTHESIS
Subcell Biochem. 2 , 321

Sharon, N. und Lis, H. (1972)
LECTINS: CELL AGGLUTINATING AND SUGAR SPECIFIC PROTEINS
Science, 177 , 949

Sherman, L.A., Lee, J. und Jacobsen, A. (1977)
QUANTITATION OF THE RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM CLEARANCE OF SOLUBLE FIBRIN
Br. J. Haematol. 37 , 231

Sitte, H. (1967)
MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ZELLEN
in: Quantitative Methoden in der Morphologie
Hrsg.: Weibel, E.R. und Elias, H.
Springer Verlag. Berlin - Heidelberg - New York

Sleyster, E.Ch. und Knook, D.L. (1982)
RELATION BETWEEN LOCALIZATION AND FUNCTION OF RAT LIVER KUPFFER CELLS
Lab. Invest. 47 , 484

Spurr, A.R. (1969)
A LOW - VISCOSITY EPOXY RESIN EMBEDDING MEDIUM FOR ELECTRON MICROSCOPY
J. Ultrastructure Research 26 , 31

Stahl, P., Six, H., Rodman, J.S., Schlesinger, P., Tulsiani, D.R.P. und Touster, O. (1976)
EVIDENCE FOR SPECIFIC RECOGNITION SITES MEDIATING CLEARANCE OF LYSOSOMAL ENZYMES IN VIVO
Proc. natu.Acad. Sci. (Wash.), 73 , 4o45

Stockert, R.J., Morell, A.G. und Scheinberg J.H. (1977)
HEPATIC BINDING PROTEIN : THE PROTECTIVE ROLE OF ITS SIALIC ACID RESIDUES
Science 197 , 667

Tamaru, T. und Fujeta, H. (1978)
ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON KUPFFER'S STELLATE CELLS AND SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS IN THE LIVER OF NORMAL AND EXPERIMENTAL RABBITS
Anat. Embryol. 154 , 125

Tanner, M.J.A. und Anstee, D.J. (1976)
THE MEMBRANE CHANCE IN En (a -) HUMAN ERYTHROCYTES; ABSENCE OF THE MAJOR ERYTHROCYTE SIALOGLYCOPROTEIN
Biochem. J. 153 , 271

Tanner, M.H.A., Jenkins, R.E., Anstee, D.J. und Clamp, J.R. (1976)
ABNORMAL CARBOHYDRATE COMPOSITION OF THE MAJOR PENETRATING MEMBRANE PROTEIN OF EN (a -) HUMAN ERYTHROCYTES
Biochem. J. 155 , 7o1

Tanuma, Y. und Ito, T. (1978)
ELECTRON MICROSCOPE STUDY ON THE HEPATIC SINUSOIDAL WALL AND FAT-STORING CELLS IN THE BAT
Arch. Histol. Jpn. 41 , 1

Tsai, C.N., Best, N. und Ebner, K.E. (1966)
RETENTION OF LACTATE DEHYDROGENASE CORTISOL BINDING AND LACK OF ENZYME INDUCTION IN RAT LIVER CELL SUSPENSION
Exp. Cell Res. 44 : 332

Turner, B.M., Fisher, R.A. und Harris, H. (1974)
THE AGE RELATED LOSS OF ACTIVITY OF FOUR ENZYMES IN THE HUMAN ERYTHROCYTE
Clin.Chim. Acta 5o , 85

Van Furth, R. (1982)
CURRENT VIEW ON THE MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM
Immunobiol. 161 , 178

Venable, J.H. und Coggeshall, R. (1965)
A SIMPLIFIED LEAD CITRATE STAIN FOR USE IN ELECTRON MICROSCOPY
J. Cell Biol. 25 , 4o7

Vömel, T. und Platt, D. (1982)
AGE - DEPENDENT RED CELL PHAGOCYTOSIS AND ACTIVITY OF THE RABBIT RETICULOHISTIOCYTIC SYSTEM
Gerontology 28 , 149

Vogt, D. (1981)
VERGLEICH EINES D-GALAKTOSE-SPEZIFISCHEN REZEPTORS AUF KUPFFERZELLEN UND HEPATOZYTEN DER RATTE
Diplomarbeit der math.nat.Fak. der Uni.Düsseldorf

Volkmann, A. (1976)
DISPARITY OF THE ORIGIN OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES POPULATIONS
J. Reticuloendothel. Soc.19 , 249

Wakefield, J.ST.J., Gale, J.S., Berridge, M.V., Jordan, T.W. und Ford, H.C. (1982)
IS PERCOLL INNOCUOUS TO CELLS?
The Biochemical Journal, 2o2 , 795

Wall, D.A., Wilson, G. und Hubbard, A.L. (198o)
THE GALACTOSE-SPECIFIC RECOGNITION SYSTEM OF MAMMALIAN LIVER: THE ROUTE OF LIGAND INTERNALIZATION IN RAT HEPATOCYTES
Cell 21 , 79

Walter, H., Krob, G.J., Tamblyn, C.H. und Seaman, G.V.F. (198o)
SURFACE ALTERATIONS OF ERYTHROCYTES WITH CELL AGE: RAT RED CELL IS NOT A MODEL FOR HUMAN RED CELL
Biochem.Biophys.Res. Commun. 97 , 1o7

Weed, R.J. (197o)
THE IMPORTANCE OF ERYTHROCYTE DEFORMABILITY
Amer.J. Med. 49 , 147

Weibel, E.R., Straubli, H.R. und Hen (1969)
CORRELATED MORPHOMETRIC AND BIOCHEMICAL STUDIES ON THE LIVER CELL
J. Cell, Biol. 42 , 68

Widmann, J.J., Cotran, R.S. und Fahimi, H.D. (1972)
MONONUCLEAR PHAGOCYTES (KUPFFER CELLS) AND ENDOTHELIAL CELLS
J. Cell Biol., 52 , 159

Widmann, J.J., Fahimi, H.D. (1975)
PROLIFERATION OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES (KUPFFER CELLS) AND ENDOTHELIAL CELLS IN REGENERATING LIVER
Am. J. Pathol. 8o , 349

Williams, A.R. und Morris, D.R. (198o)
THE INTERNAL VISCOSITY OF THE HUMAN ERYTHROCYTE MAY DETERMINE ITS LIFESPAN IN VIVO
Scand. J. Haematol 24 , 57

Wisse, E. (197o)
AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE FENESTRATED ENDOTHELIAL LINING OF RAT LIVER SINUSOIDS
J. Ultrastruct. Res. 31 , 125

Wisse, E. (1974)
OBSERVATIONS ON THE FINE STRUCTURE AND PEROXIDASE CYTOCHEMISTRY OF NORMAL RAT LIVER KUPFFER CELLS
J. Ultrastruct. Res. 46 , 393

Wisse, E. (1977)
ULTRASTRUCTURE AND FUNCTION OF KUPFFER CELLS AND OTHER SINUSOIDAL CELLS IN LIVER
in: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells
Hrsg.: Wisse, E. und Knook, D.L.
Elsevier/North Holland

Wisse, E. (198o)
ON THE FINE STRUCTURE AND FUNCTION OF RAT LIVER KUPFFER CELLS
in: The Reticuloendothelial System, a Comprehensive Treatise
Hrsg.: Carr, J. und Daems, W.T.
Plenum Press. New York und London

Wisse, E., van't Noordende, J.J., van der Neulen, J. und Daems, W.T. (1976)
THE PIT CELL: DESCRIPTION OF A NEW TYPE OF CELL OCCURRING IN RAT LIVER SINUSOID AND PERIPHERAL BLOOD
Cell Tissue Res. 173 , 423

Yaari, A. (1969)
MOBILITY OF HUMAN RED BLOOD CELLS OF DIFFERENT AGE GROUPS IN AN ELECTRIC FIELD
Blood, 33 , 159

Herrn Professor Dr. W. Vogell danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die Förderung dieser Arbeit. Frau Dr. J. Schlepper-Schäfer und Frau Dr. V. Kolb-Bachofen danke ich herzlich für Ihre Anregungen in zahlreichen Diskussionen. Frau Dr. J.Schlepper-Schäfer schulde ich hierbei besonderen Dank für die intensive Betreuung dieser Arbeit und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.
Mein besonderer Dank gilt auch den vielen Mitarbeitern des Institutes für Elektronenmikroskopie und Biophysik, die mich bei der Durchführung der Versuche tatkräftig unterstützten.

Lebenslauf

17.6.1957	Geburt als zweiter Sohn der Eheleute Carl und Irmgard Hoffmann, geb. Eßer, in Moers
Ostern 1964	Einschulung in die kath. Volksschule 33 in Krefeld
Juni 1967	Wechsel zur Fichte-Schule, mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Krefeld
Juni 1976	Abitur an der Fichte-Schule
Oktober 1976	Beginn des Studiums der Human-Medizin an der Universität Düsseldorf
August 1978	Ärztliche Vorprüfung
November 1982	Ärztliche Prüfung
Februar 1983	Beginn des Wehrdienstes als Stabsarzt in Hemer/Sauerland
Seit 1.11.1983	Assistenzarzt am Institut für Anästhesie und Intensivmedizin der Universitätskliniken Homburg/Saar
2.12.83	Heirat mit Ursula Esser

Krefeld, den 2.3.1984 gez.: Klaus Hoffmann